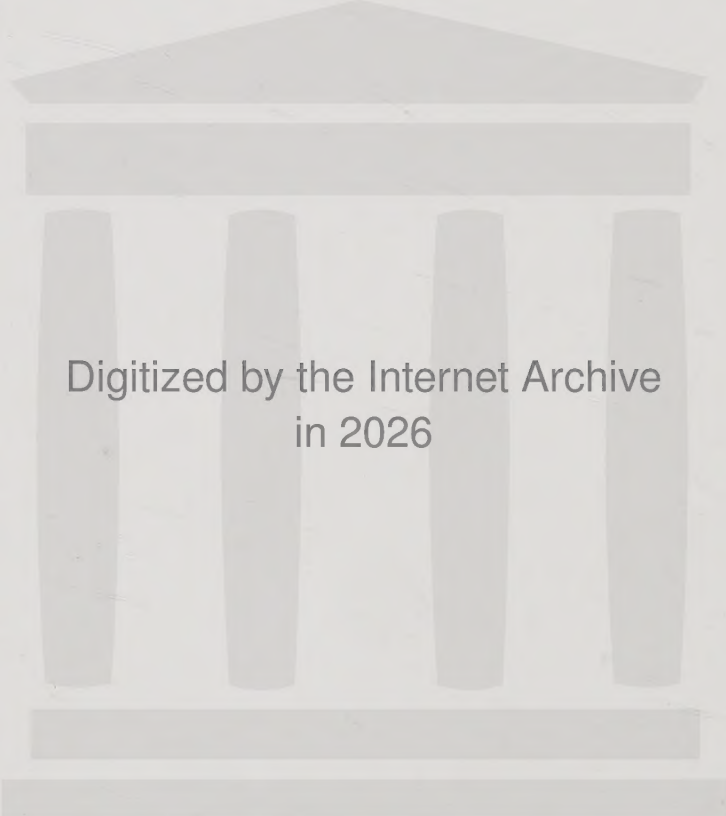


**Cyanogene Verbindungen in Sapindaceen:
STRUKTUR und VERTEILUNG**
am Beispiel von
Heterodendron oleaefolium Desf.
und
Cardiospermum grandiflorum Sw.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Winfried Hübeler
aus Bielefeld

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550803_0051

**Cyanogene Verbindungen in Sapindaceen:
STRUKTUR und VERTEILUNG
am Beispiel von
Heterodendron oleaefolium Desf.
und
Cardiospermum grandiflorum Sw.**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwig-Universität zu Freiburg i. Br.**

**vorgelegt von
Winfried Hübel
aus Bielefeld**

1978

Dekan: Prof. Dr. Horst RIMPLER
Leiter der Arbeit: Prof. Dr. Adolf NAHRSTEDT
Referent: Prof. Dr. Adolf NAHRSTEDT
Koreferent: Prof. Dr. Horst RIMPLER

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses: 8. Juni 1978



Einige Ergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

- W. HÜBEL und A. NAHRSTEDT: Ein neues Cyanglykosid aus
Heterodendron oleaefolium, Phytochem. 14,
2723 (1975)
- A. NAHRSTEDT und W. HÜBEL: Die cyanogenen Verbindungen
von Heterodendron oleaefolium Desf. (Sapindaceae)
Phytochem. 17, 314 (1978)

Für Maria

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Natürliche Nitrile	1
1.2. Struktur und Biosynthese cyanogener Glykoside und Lipide	3
1.3. Pharmakologie und Toxikologie	8
1.4. Zielsetzung der Arbeit	9
2. AUSWAHL DER VERSUCHSPFLANZEN	11
3. METHODEN ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG CYANOGENER NATURSTOFFE	15
3.1. Cyanglykoside	15
3.1.1. Quantitative Bestimmung	15
3.1.1.1. Freisetzung der Blausäure	16
3.1.1.2. β -Glukosidase aus <i>C. grandiflorum</i>	17
3.1.1.3. Quantitative Hydrolyse der Cyanglykoside aus <i>C. grandiflorum</i> mit Emulsin	20
3.1.1.4. Quantitative Bestimmung von Blausäure	20
3.1.2. Dünnschicht- und Papierchromatographie	21
3.1.3. Qualitative Gaschromatographie	22
3.1.4. Quantitative Gaschromatographie	23
3.2. Cyanolipide	24
3.2.1. Quantitative Bestimmung	24
3.2.2. Dünnschichtchromatographie	25
3.2.3. Säulenchromatographie	26
3.2.4. Hochdruckflüssigchromatographie	26
3.2.5. ^1H -Kernresonanzspektroskopie	28
4. DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN AUS HETERODENDRON OLEAEFOLIUM DESF.	29
4.1. Pflanzenmaterial	29
4.2. Die cyanogenen Glykoside aus <i>H. oleaeifolium</i>	30

	Seite
4.2.1.	Isolierung der Glykoside 30
4.2.2.	Strukturaufklärung 30
4.2.3.	Die absolute Konfiguration von Butyronitrilglykosiden 37
4.3.	Die Cyanolipide von <i>H. oleae-folium</i> 44
4.3.1.	Isolierung der Cyanolipide 44
4.3.2.	Charakterisierung des Cyanolipidtypes 46
4.3.3.	Hochdruckflüssigchromatographie der Cyanolipide 47
4.3.4.	Bestimmung der Fettsäuren 49
4.4.	Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse 51
5.	DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN AUS <i>CARDIOSPERMUM GRANDIFLORUM</i> SW. 55
5.1.	Pflanzenmaterial 55
5.2.	Die cyanogenen Glykoside aus <i>C. grandiflorum</i> 55
5.2.1.	Isolierung der Glykoside 56
5.2.2.	Beiträge zur Strukturaufklärung des "polaren Glykosides" aus <i>C. grandiflorum</i> 56
5.3.	Die Cyanolipide aus <i>C. grandiflorum</i> 58
5.3.1.	Isolierung der Cyanolipide 58
5.3.2.	Charakterisierung des Cyanolipidtypes 58
5.3.3.	Hochdruckflüssigchromatographie der Cyanolipide 61
5.3.4.	Bestimmung der Fettsäuren 62
5.4.	Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse 63
6.	DIE ONTOGENETISCHE VARIABILITÄT DER CYANOGENEN VERBINDUNGEN, UNTERSUCHT AN <i>C. GRANDIFLORUM</i> 66

	Seite
6.1.	Pflanzenmaterial 66
6.2.	Der Blausäuregehalt von <i>C. grandiflorum</i> 69
6.2.1.	Bestimmung der Blausäure aus Cyan- glykosiden 69
6.2.2.	Quantitative Bestimmung der Cyano- lipide 74
6.2.3.	Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse 74
6.3.	Quantitative Bestimmung der cyano- genen Glykoside in <i>C. grandiflorum</i> 77
6.3.1.	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials 78
6.3.2.	Dünnschichtchromatographie 80
6.3.3.	Gaschromatographische Bestimmung von Cardiospermin 80
6.3.4.	Die Verteilung der cyanogenen Gly- koside in einzelnen Organen von <i>C. grandiflorum</i> im Verlauf einer Vegetationsperiode 83
6.3.5.	Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse 91
7.	DISKUSSION 93
8.	EXPERIMENTELLER TEIL 101
8.1.	Pflanzenmaterial 101
8.1.1.	<i>Heterodendron oleaeifolium</i> Desf. 101
8.1.2.	<i>Cardiospermum grandiflorum</i> Sw. 101
8.1.2.1.	Sammeln der Proben 101
8.1.2.2.	Vorbereiten der Proben 101
8.2.	Aufarbeiten des Pflanzenmaterials 102
8.2.1.	Isolierung von Cyanglykosiden 102
8.2.2.	Isolierung von Cyanolipiden 103
8.2.3.	Aufarbeitung zur quantitativen Blausäurebestimmung 103
8.2.4.	Aufarbeitung zur quantitativen gas- chromatographischen Cyanglykosid- bestimmung 107

	Seite
8.3.	Quantitative Blausäurebestimmung 104
8.3.1.	Säurehydrolyse 104
8.3.2.	Enzymatische Hydrolyse 104
8.3.3.	Modifizierte enzymatische Hydrolyse 105
8.3.4.	Bestimmung der Blausäure 106
8.4.	Enzympräparationen 107
8.4.1.	Herstellung der Enzympräparation aus <i>C. grandiflorum</i> 107
8.4.2.	Herstellung der Enzympräparation aus Leinsamen 107
8.4.3.	Testung der Enzympräparationen 107
8.5.	Hydrolyse von Cyanolipiden 109
8.6.	Hydrolyse von Heterodendrin 100
8.7.	Flüssigkeitschromatographische Systeme für Cyanglykoside 111
8.7.1.	Papierchromatographie 111
8.7.2.	Dünnschichtchromatographie 111
8.7.3.	Säulenchromatographie 112
8.7.4.	Detektionsmethoden 113
8.8.	Flüssigkeitschromatographische Systeme für Cyanolipide 115
8.8.1.	Dünnschichtchromatographie 115
8.8.2.	Säulenchromatographie 116
8.8.3.	Hochdruckflüssigchromatographie 116
8.8.4.	Detektionsmethoden 117
8.9.	Dünnschichtchromatographie von 2-Methylpropanal 117
8.10.	Dünnschichtchromatographie von Glukose 118
8.11.	Gaschromatographie von Cyanglykosiden 118

	Seite
8.11.1.	Qualitative GC 119
8.11.2.	Quantitative GC 120
8.12.	Gaschromatographie von 2-Methyl- propanal 121
8.13.	Gaschromatographie von Fettsäuren 121
8.13.1.	2-Hydroxy-3-methylbuttersäure 121
8.13.2.	Fettsäuren aus Cyanolipiden 122
8.14.	Gaschromatographie von Glukose 122
8.15.	Bestimmung des molaren Verhält- nisses von Glukose zu Cyanid im "polaren Cyanglykosid" aus C. grandiflorum 123
8.16.	Hydrierung von Proacacipetalin 125
8.17.	Darstellung von 2(S)-2-Hydroxy- 3-methylbuttersäure 125
8.18.	Schmelzpunkt und optische Drehung von acetyliertem Heterodendrin und Cardiospermin 126
8.19.	Brechungsindex von Cyanolipiden 127
8.20.	Molekulargewichtsbestimmung von Heterodendrin 127
8.21.	Infrarotspektroskopie 129
8.22.	¹ H-Kernresonanzspektroskopie 129
9.	ANHANG 131
10.	ZUSAMMENFASSUNG 143
11.	LITERATUR 145

1. EINLEITUNG

1.1. Natürliche Nitrile

Seit SCHRADER 1803 beobachtete, daß zerkleinerte bittere Mandeln Blausäure entwickeln, befaßt sich die Naturstoffchemie mit dem Phänomen Cyanogenese, einer in der belebten Natur weitverbreiteten Erscheinung. Über die Anzahl der bei den Pflanzen als cyanogen bekannten Taxa finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben: Während EYJOLFSSON (1971) und CONN (1973) 800 Arten aus 70 bis 80 Familien angeben, nennt SEIGLER (1975 a, 1977 a) bereits 1000 Arten aus 90 Familien. HEGNAUER (1977) zählt sogar allein bei den Magnoliophytina mehr als 2000 cyanogene Arten auf. Dazu kommen noch 6 Coniferophytina -, 30 Farn-, 25 Pilz- und 5 Bakterienspezies (EYJOLFSSON 1968; HEGNAUER 1977). Doch nicht nur bei Pflanzen, sondern auch bei Tieren - Arthropoden und Lepidopteren - tritt Cyanogenese auf (JONES et al. 1962; EISNER et al. 1963a; EISNER et al. 1963b).

Obwohl der Chemismus der Blausäurenabgabe bei der überwiegenden Anzahl der Arten unbekannt ist (SEIGLER 1977a; HEGNAUER 1977), scheint die Cyanogenese bis auf wenige Ausnahmen an das Vorhandensein von cyanogenen Glykosiden gebunden zu sein (CONN 1969, 1973). Blausäureglykoside treten in allen drei Haupttaxa der Gefäßpflanzen, den Pteridophyta, den Coniferophytina und den Magnoliophytina auf, wobei jede dieser Klassen spezifische Biosynthesewege aufweist (HEGNAUER 1977).

Über den chemotaxonomischen Wert der cyanogenen Glykoside besteht noch keine Übereinstimmung: Während in vielen Arbeiten die Bedeutung der Blausäureglykoside vor allem auf der Stufe niederer Taxa - Familien, Arten, Unterarten - gesehen wird (DILLEMANN 1958; EYJOLFSSON 1968; NAHRSTEDT 1973), zieht HEGNAUER (1977) dieses Merkmal in seiner jüng-

sten Übersicht zu diesem Problem auch für höhere Taxa und zur Evolutionsforschung heran.

Neben den Blausäureglykosiden und den schon erwähnten Cyanolipiden, die bislang nur in den Samenölen der Sapindaceen gefunden wurden (SEIGLER 1977b), sind auch andere sekundäre Pflanzenstoffe mit Nitrilstruktur bekannt. Allerdings sind nur diejenigen cyanogen, die genuin oder nach Hydrolyse Cyanhydrine darstellen.

Nicht glykosidierte Cyanogene wurden aus Pilzen (Glyoxalsäurecyanhydrin und Brenztraubensäurecyanhydrin) isoliert (TAPPER und MCDONALD 1974). Im Verteidigungssekret von Milipeden wurden neben Benzoylcyanid Mandelonitril und Mandelonitrilbenzoat gefunden (CONNER et al. 1977).

Nicht cyanogene Nitrilglykoside konnten in Buxaceen (ELLINGER et al. 1973, 1974), Boraginaceen (SOSA et al. 1977) sowie in Caesalpiniaceen (DWUMA-BADU et al. 1976) nachgewiesen werden. Diese Verbindungen stellen glukosidierte Cyanomethylencyclohexanderivate dar. Ihre Biosynthese ist unbekannt.

Die Gruppe der nicht glykosidierten Nitrile ist sehr heterogen. Hierher gehören neben den aus Strychnosarten isolierten Cyanoalkaloiden* (BISSET et al. 1974) auch Verbindungen, die dem Glukosinolatstoffwechsel entstammen (COLE 1976).

In Cruciferen wurden Cyanalkansulfoxide (ANOM. 1973), Cyanepithioalkane (VAN ETTEN und DAXENBICHLER 1971; COLE 1975, 1976; MCLEOD und MCLEOD 1977), in Cruciferen und Ericaceen Phenylacetonitrilhomologe (BALLESTER et al. 1975; COLE 1976) gefunden. Zu den nicht glykosidierten Nitrilen gehören auch die lathyrogenen Verbindungen der Fabaceen, die β -Cyanoamino-säurederivate darstellen (SARMA und PADMANBAN 1969).

Eine weitere Gruppe von cyanogenen Pflanzenstoffen, die sogenannten pseudocyanogene Glykoside, soll an dieser Stelle

* Es ist nicht geklärt, ob es sich um genuine Pflanzenstoffe oder um Artefakte handelt (BISSET et al. 1974).

nur kurz erwähnt werden. Hierbei handelt es sich nicht um Nitrile sondern um Methylazoxomethanolderivate. Fünf Vertreter dieser Verbindungsklasse wurden bislang aus den Samen von Cycadaceen isoliert. Anders als die cyanogenen Glykoside spalten diese Körper nur unter Einwirkung von verdünnten Laugen Blausäure ab. Die Biochemie der pseudocyanogenen Glykoside ist nicht untersucht (SEIGLER 1977a).

1.2. Struktur und Biosynthese cyanogener Glykoside und Lipide

Cyanogene Glykoside stellen am α -Hydroxyl glukosidierte Cyanhydrine dar. Derzeit sind die Strukturen von 24 derartigen Verbindungen bekannt.

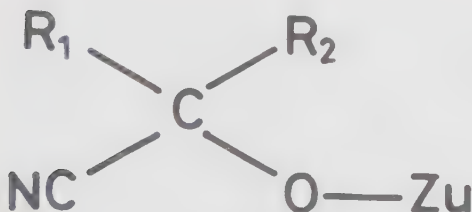


Abbildung 1.

R_1 und R_2 sind aliphatische oder aromatische Reste. Bei aromatischer Substitution an R_1 und R_2 immer Wasserstoff. Als Zuckerkomponenten treten neben Glukose in einigen Fällen Diosen auf, auch ein Bidesmosid wurde beschrieben.

Abweichend von diesem Baumuster ist das Nandina glykosid nicht am Cyanhydrin- sondern am phenolischen Hydroxyl des Aglykon glykosidiert.

Als biogenetische Vorstufen der cyanogenen Glykoside fungieren nach derzeitigem Wissen die Aminosäuren Valin, I-Leucin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und - hypothetisch - die nicht proteinogene Aminosäure Cyclopentenylglycin (HEGNAUER 1977).

Die Cyanolipide sind den cyanogenen Glykosiden analog gebaut, es handelt sich hierbei um Fettsäureester von Butyronitril-derivaten. Sie sind, wenn sie Cyanhydrinstruktur aufweisen, cyanogen und spalten dann unter Säure- oder Alkalieinfluß nach Verseifen des Esters Blausäure ab (KUNDU und BANDYO-PADHYAY 1969; KUNDU 1970; SEIGLER et al. 1970). Auch bestimmte Lipasen sollen Cyanolipide hydrolysieren können (MIKOLAJ-CZAK et al. 1970 c).

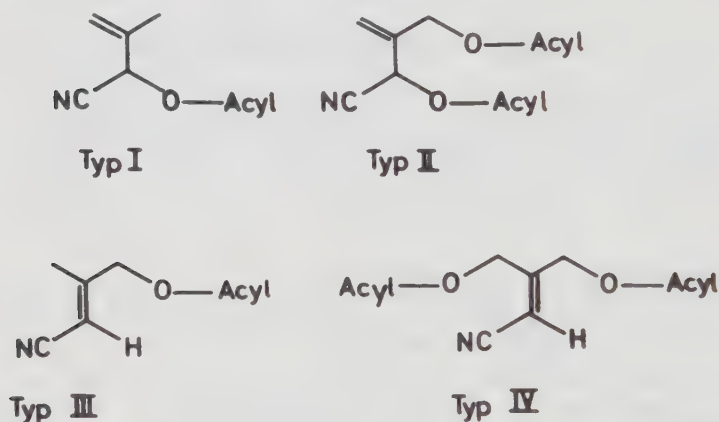


Abbildung 2: Die Cyanolidtypen nach HEGNAUER (1971).

Bereits 1923 vermutete ROSENTHALER in den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, und Valin die biogenetischen Vorstufen von Prunasin, Dhurrin und Linamarin. Doch erst die Isotopentechnik erlaubte es, mit Hilfe von markierten Aminosäuren exakte Aussagen über die Biogenese zu machen.

Die erste faßbare Zwischenstufe ist das Aldoxim (Abb.3,III).Die Umsetzung der Aminosäuren zur N-Hydroxamsäure wird offenbar von hoch substratspezifischen Enzymen katalysiert, da immer nur eine Aminosäure von einer Pflanze umgesetzt wird*.

*Linamarin und Lotaustralin treten häufig vergesellschaftet auf, die Spezifität der an der Biosynthese beteiligten Enzyme reicht offenbar nicht aus, zwischen den homologen Aminosäuren Valin und I-Leucin zu differenzieren (BUTLER et al. 1965; HALBROCK und CONN 1970, 1971).

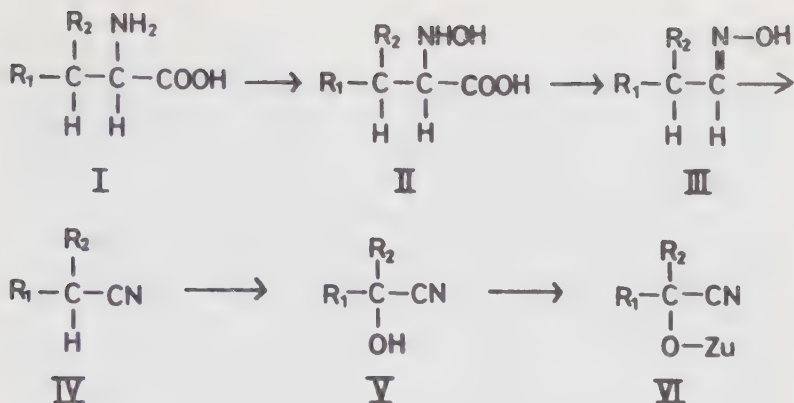


Abbildung 3: Der Biosyntheseweg der cyanogenen Glykoside nach CONN (1973) und SHIMIDA und CONN (1977).

Die Reaktion von IV nach V verläuft sehr stereospezifisch (ZILG et al. 1972; BISSET et al. 1969), denn diastereomere Glykosidpaare wurden bislang noch nie in derselben Pflanze gefunden*. Bemerkenswert ist, daß die Glukosinolate, deren Biosynthese formal bei III abzweigt, nicht mit Blausäureglykosiden vergesellschaftet auftreten (UNDERHILL und WETTER 1969; ROBINSON 1963).

Die Biogenese der Cyanolipide ist weitgehend unbekannt. Anhand von Fütterungsversuchen konnten SEIGLER und Mitarbeiter feststellen, daß Leucin als Vorstufe genutzt wird (SEIGLER und BUTTERFIELD 1976b; SEIGLER und KENNARD 1977c).

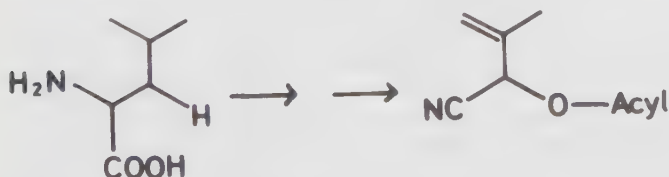


Abbildung 4: Biosynthese von Cyanolipiden

* Bei den in der Literatur beschriebenen Diastereomerenpaaren handelte es sich um Aufarbeitungsartefakte (PLOUVIER 1935; NAHRSTEDT 1975).

Wie schon LIEBIG und WÖHLER (1837) am Amygdalin beobachteten, werden Blausäureglykoside durch β -Glukosidasen in Carbonylkomponente, Blausäure und Zucker zerlegt. Die Reaktionsfolge ist von HAISMANN und KNIGHT (1967) genauer untersucht worden. Dieselben Reaktionsprodukte treten bei Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren auf. Die Umsetzung verläuft bei Einsatz geeigneter Enzyme quantitativ und läßt sich zur indirekten Bestimmung der Cyanglykoside über die entstandene Blausäure verwenden. Bei Behandlung mit konzentrierten Mineralsäuren oder Laugen dagegen wird nach Spaltung der glykosidischen Bindung das Nitril zur entsprechenden α -Hydroxysäure verseift (KOFOD und EYJOLFSSON 1969).

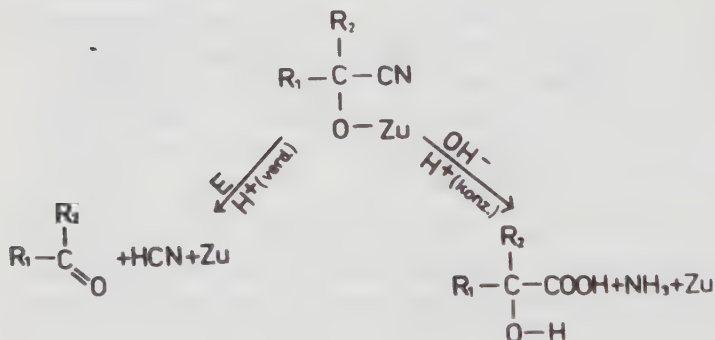


Abbildung 5: Abbau der cyanogenen Glykoside.

In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, daß ein Abbau der cyanogenen Verbindungen auch in der intakten Pflanze stattfinden kann (DE WAAL 1942; ABROL und CONN 1966; ABROL et al. 1966; TSCHIERSCHE 1966; BOUGH und GANDER 1971; DEMENT und MOODEY 1974; SEIGLER 1976a).

Freie Blausäure ist ein starkes Zellgift, es müssen daher in der Pflanze Entgiftungswege existieren. Hierfür kommt, neben

der direkten Abgabe von Cyanwasserstoff in den Luftraum (WEISS 1960) die Bindung an Aminosäuren wie Serin (TSCHIERSCHE 1963) oder Cystein (BLUMENTHAL et al. 1968) in Frage. DUNNILL und FOWDEN (1965) konnten am Beispiel einiger Fabaceen zeigen, daß β -Cyanolalanin, das Kondensationsprodukt aus Blausäure und Cystein, zu Asparagin oder γ -Glutamyl- β -cyanoalanin umgesetzt wird. Die Bildung von Asparagin wurde auch von (TSCHIERSCHE 1963) beobachtet. Ein weiterer Weg der Entgiftung von Blausäure ist die Umsetzung zu Rhodanid (BERSIN 1958).

Die Bedeutung der cyanogenen Glykoside und der Cyanolipide für die Pflanze ist ungeklärt. Als mögliche Funktionen werden Stoffwechselendprodukt, Zwischenstufe im Stickstoffmetabolismus und Abwehrstoff diskutiert (ROBINSON 1930; JONES 1972, 1973; HEGNAUER 1977). Nachdem ein "turn-over" für Blausäureglykoside und -lipide nachgewiesen wurde (BOUGH und GANDER 1971; SEIGLER und PRICE 1976a), lassen sich diese Verbindungen kaum noch als Endprodukte eines Stoffwechselweges ansprechen (SCHÜTTE 1973). Eine Speicherfunktion für Aminosäuren (TSCHIERSCHE 1967) trifft nach NAHRSTEDT (1971) nicht zu. GRIMMER (1955) berichtet über die allelopathische Wirkung der aus Glykosiden freigesetzten Blausäure. Mollusken, Insekten und Warmblüter bevorzugen bei polymorphen Stämmen die cyanglykosidfreien Formen (CRAFORD-SIDEBOTHAM 1972; JONES 1973; COOPER-DRIVER und SWAIN 1976; ELLIS et al. 1977); allerdings widersprechen ältere Arbeiten dieser Ansicht (BISHOP und KORN 1969; CORKILL 1952). Eine weitere Deutungsmöglichkeit führen SEIGLER und PRICE (1976a) an, die auf die in neuerer Zeit für eine Anzahl sekundärer Pflanzenstoffe gefundenen regulatorischen Aufgaben hinweisen (STENLID 1963, 1968, 1970). Für die Annahme spricht, daß bestimmte Enzyme wie z.B. Papain, durch Blausäure aktiviert werden (WALDSCHMIDT-LEITZ 1958; LÜDTKE 1952). Dennoch ist nach dem derzeitigen Stand des Wissens anzunehmen, daß die größte Bedeutung der Cyanglykoside in ihrer Funktion als Repellens gegen Fraßfeinde liegt.

1.3. Pharmakologie und Toxikologie

Die pharmakologische Bedeutung der cyanogenen Pflanzenstoffe beschränkte sich lange Zeit auf heute obsoleter Zubereitungen wie Aqua amygdalarum amarum oder Aqua laurocerasi. In neuerer Zeit wird jedoch der Einsatz dieser Verbindungen in der Krebstherapie diskutiert (NEUNHOEFFER 1974; NORMANN 1975). Die cancerostatische Wirkung soll darauf beruhen, daß Tumorzellen neben einer erhöhten β -Glukosidaseaktivität eine geringere Entgiftungskapazität für Blausäure und eine größere Empfindlichkeit gegen Störungen der Sauerstoffverwertung als gesunde Zellen aufweisen. Diese Annahmen konnten durch Tierversuche aber nicht erhärtet werden (WODINSKY und SWINIARSKI 1975; HILL et al. 1976; LASTER und SCHNABEL 1975). FENSELAU et al. (1977) wiesen sogar für einige Cyanglykoside mutagene Aktivität nach. Trotzdem werden amygdalinhaltige Präparate z. B. in den USA und in der Bundesrepublik als Cancerostatica angeboten.

Große Bedeutung kommt den pflanzlichen Nitrilen auf dem Gebiet der Toxikologie zu. Über Vergiftungsfälle mit tragischem Ausgang durch Blausäureglykoside wurde in der Literatur mehrfach berichtet (WATT und BREYER-BRANDWIJK 1962; KINGSBURY 1964). Allerdings sind nicht die intakten Glykoside für diese Unfälle verantwortlich - die LD_{50} von Amygdalin für Mäuse liegt bei 100 mg/kg Körpergewicht (WODINSKY und SWINIARSKI 1975) - sondern freie Blausäure, die sich durch körpereigene oder durch das Pflanzenmaterial eingetragene β -Glukosidasen bildet.

* In den USA werden diese Präparate inzwischen als Vitamine geführt (Consumers Rep. 1977)

**B 17 Orotrat, Nadrol Chemie

***HUMBERT et al. (1977) dagegen berichten von der tödlichen Vergiftung eines elf Monate alten Kindes, das zwischen einer und fünf Amygdalintableten zu 500 mg gegessen hatte.

In Gegenden, in denen cyanglykosidhaltige Pflanzen Grundnahrungsmittel darstellen, wie beispielsweise *Manihot esculenta* Crantz (Cassava) in weiten Teilen der Tropen (NESTEL 1973), treten chronische Blausäurevergiftungen auf, die sich in nervösen Bewegungsstörungen und Kropfbildung manifestieren (OSUNTOKUN 1973; EKPECHI 1973; DELANGE et al. 1973). Ein ähnliches Phänomen ist der Lathyrismus, der bei chronischem Verzehr von bestimmten Fabaceen-Samen auftritt. In manchen Gegenden Indiens machen diese Samen einen wesentlichen Bestandteil der Nahrung der einheimischen Bevölkerung aus (SARMA und PADMANBAN 1969).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Sapinadeceen sind eine artenreiche Familie der Tropen und Subtropen (RADLKOFFER 1934). Cyanogenese tritt sowohl in den vegetativen Teilen als auch in den fetten Ölen der generativen Einheiten auf (HEGNAUER 1973). ROSENTHALER (1920) vermutete im Samenöl von *Schleichera trijuga* fettlösliche Cyanhydrine. Diese Hypothese wurde von MIKOLAJCZAK et al. (1969, 1970a) bestätigt, die vier Grundtypen von Cyanolipiden isolierten (siehe Abbildung 2). Der Chemismus der Blausäureabgabe in den vegetativen Teilen der Sapindaceen blieb dagegen ungeklärt.

Cyanogenese ist bei den Sapindaceen ein Tendenzmerkmal, denn nicht alle Arten bilden Blausäureglykoside oder -lipide (HEGNAUER 1973). Um die biologische und taxonomische Bedeutung der Cyanogenese in dieser Familie besser zu verstehen, ist die Kenntnis der cyanogenen Verbindung in den generativen wie vegetativen Organen nötig.

Daneben soll die ontogenetische Variation der Cyanverbindungen in den einzelnen Organen untersucht werden.

Bei vielen cyanogen Species treten die Cyanoverbindungen zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichen Organen auf (HEGNAUER 1977; SEIGLER 1975a). Deshalb setzt die vollständige Erfassung der cyanogenen Verbindungen einer Art die Kenntnis der ontogenetischen Variation voraus. Auch Fragen nach dem Einfluß der Organentwicklung und einem möglichen Transport können ohne vorherige ontogenetische Untersuchungen nicht geklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich folgender Fragenkomplex formulieren:

1. Welche Organe der Pflanze sind cyanogen?
2. Welche cyanogenen Verbindungen liegen vor?
3. Welchen Veränderungen unterliegen die cyanogenen Verbindungen in den einzelnen Organen im Verlauf einer Vegetationsperiode?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen den cyanogenen Verbindungen der Samenöle und denen der vegetativen Organe?

2. AUSWAHL DER VERSUCHSPFLANZEN

Um die unter 1.4 geschilderten Aufgaben durchführen zu können, mußten geeignete Species gefunden werden. Deshalb wurden alle erreichbaren Sapindaceen-Arten einem Screening unterworfen. Bei der Ernte und Aufarbeitung des Pflanzenmaterials wurde darauf geachtet, daß keine Zersetzungen der cyanogenen Verbindungen oder Artefaktbildung durch prä- oder postmortale Prozesse eintraten.

Das Material wurde unmittelbar nach der Ernte in flüssigen Stickstoff eingebracht und in gefrorenem Zustand zerkleinert (LIST 1968). Danach wurde es gefriergetrocknet, um enzymatische Umsetzungen zu unterbinden, die bei Wassergehalten unter 5 % praktisch nicht mehr ablaufen (ACKER 1968). Das trockene Material wurde, wenn es nicht sofort weiterverarbeitet werden konnte bei -25°C gelagert. Eigene Versuche mit Blättern von *C. grandiflorum* ergaben, daß im luftgetrockneten Material nur 45 % der Cyanidaktivität enthalten ist, die in der gleichen Menge gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial gefunden wird. Eine Übersicht über die Problematik der Aufarbeitung cyanogenen Pflanzenmaterials gibt NAHRSTEDT (1971).

Die untersuchten Arten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle Proben - mit Ausnahme von *Heterodendron oleaefolium* Desf. und *Koelreuteria paniculata* Laxm. - stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Freiburg. Ein Exemplar von *Koelreuteria paniculata* befindet sich in einem Privatgarten in Freiburg, Urbanstraße. Blätter von *Heterodendron oleaefolium* wurden uns von der City Park Administration, Canberra, Australien, und den Royal Botanical Gardens and National Herbarium Sydney, Australien, zur Verfügung gestellt.

Untersucht wurden jeweils einige Blätter, die einer Dreistufenextraktion unterworfen wurden. Dabei wurde nacheinander je 6 h lang mit Petroläther, Dichlormethan und Me-

	Petroläther	Dichlormethan	Methanol
<i>Cardiospermum grandiflorum</i> Sw.	-	-	+++
<i>Cardiospermum halicacabum</i> L. Amoen.	-	-	++
<i>Dodonea viscosa</i> (L.) Jacq.	-	-	+
<i>Dodonea viscosa</i> (L.) Jacq. var. <i>purpurea</i>	-	-	+
<i>Greya radlkoferi</i> L.	-	-	+
<i>Heterodendron oleaeifolium</i> Desf.	-	-	+++
<i>Koelreuteria paniculata</i> Laxm.	-	-	+
<i>Sapindus mukorossi</i> Gärtn.	-	-	-
<i>Serjania giabrata</i> Kunth.	-	-	-

Tabelle 1: Auf Cyanogenese untersuchte Sapindaceen-Arten

- keine Blausäure nachweisbar
- + bis 10 ppm Blausäure
- ++ 10 bis 500 ppm Blausäure
- +++ über 500 ppm Blausäure

thanol extrahiert. Jede Fraktion wurde dann für sich auf Blausäure geprüft, indem die beiden ersten einer alkalischen Hydrolyse mit anschließendem Blausäuretest (s.8.5.) unterworfen wurden. Die Methanolfraction wurde nur sauer hydrolysiert (s.8.3.1.). Diese Versuchsanordnung schließt falsch positive Ergebnisse aus, die durch cyanogene Glykoside in den beiden ersten Fraktionen verursacht werden könnten.

Wie bereits unter 1.2. dargestellt, entwickeln Cyanolipide sowohl bei saurer wie auch bei alkalischer Hydrolyse nach Esterspaltung Blausäure, sofern das Molekül eine Cyanhydringruppierung aufweist. Die Nitrilgruppen der cyanogenen Glykoside dagegen werden unter Alkalieinfluß über das Carbonsäureglykosid zur Carbonsäure verseift (KOFOD und EYJOLFSSON 1969). Cyanolipide, die keine α -ständige Hydroxylgruppe aufweisen, spalten im Gegensatz zu den Cyanhydrinen weder unter Säure- noch unter Alkalieinfluß Blausäure ab. Diese Verbindungen lassen sich im Samenöl⁻¹ aber durch ihre deutlich sichtbare Absorption bei 2220 cm⁻¹ (Nitrilbande) im Infrarot-Spektrum nachweisen (BELLAMY 1966; SEIGLER 1974a).

Wie Tabelle 1 zeigt, sind *Cardiospermin grandiflorum* Swartz und *Heterodendron oleaefolium* Desf.* am stärksten blausäurehaltig. Nach der beschriebenen Versuchsanordnung lassen sich cyanogene Glykoside als Ursache für die Cyanogenese vermuten.

H. Oleaefolium, "Cottonwood", ist ein in Australien beheimateter Baum. PETRIE (1920) berichtete von Viehvergiftungen mit tödlichem Ausgang, als in Dürreperioden die Blätter dieses Baumes an Schafe und Kühe verfüttert wurden. Seine Untersuchungen ergaben Blausäuregehalte bis zu 0,38 % HCN, bezogen auf das Blatttrockengewicht. Auch das fette Öl einzelner Samen, die wir zusammen mit den Blattmustern erhalten hatten, zeigten nach Behandlung mit Alkali bzw. Säuren (s.8.5.) Cyanogenese.

* RADLKOFER (1934) erwähnt auch die Schreibweise *H. oleifolium* Desf.

Für die vorgesehenen Untersuchungen zur Struktur von Sapindaceen-Cyanogenen stellt *H. oleaefolium* ein lohnendes Objekt dar, da sowohl die generativen wie die vegetativen Organe ungekannte cyanogene Verbindungen enthalten. Leider ließ sich die Pflanze für die in 1.4. angesprochenen ontogenetischen Arbeiten nicht heranziehen, da im Raum Freiburg kein Exemplar vorhanden ist.

C. grandiflorum Sw. ist ein im Süden des nordamerikanischen Kontinents verbreitetes Unkraut (RADLKOFER 1934). Wegen der Form seiner Früchte und Blätter führt es den Namen "balloonwine". Die mit Ranken kletternde Pflanze läßt sich im Gewächshaus kultivieren und durch Stecklinge vermehren. Die cyanogenen Verbindungen sowohl der vegetativen Organe als auch der Samen waren zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit nicht bekannt. Dagegen sind die Cyanolipide der nahe verwandten Art *C. halicacabum* L. von MIKOLAJCZAK und Mitarbeitern (1970b) aufgeklärt worden. Aufgrund ihres hohen Blausäuregehaltes und der Möglichkeit, durch vegetative Vermehrung genetisch einheitliches Pflanzenmaterial in ausreichender Menge anziehen zu können, wählten wir diese Species für die nach 1.4. vorgesehenen ontogenetischen Versuche aus.

3. METHODEN ZUR QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNG CYANOGENER NATURSTOFFE

Um die in 1.4. gesetzten Ziele erfüllen zu können, war es notwendig, über geeignete qualitative und quantitative Methoden zur Bestimmung von cyanogenen Verbindungen zu verfügen. Aus dem in 2. Gesagten geht hervor, daß in den Sapindaceen cyanogene Verbindungen vorkommen, die unterschiedlichen chemischen Stoffklassen angehören. Daher müssen auch die Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung dieser Verbindungen entsprechend differieren. Während die Dünnschichtchromatographie – zumindest an Kieselgelschichten – wie auch die Flüssigchromatographie für beide Substanzgruppen geeignete Methoden darstellen, lassen sich Cyanolipide – im Gegensatz zu den Cyanglykosiden – nur unter drastischen Bedingungen der Chromatographie in der Gasphase unterwerfen. Quantitative Aussagen läßt dieses Verfahren nicht zu, da unter der thermischen Belastung Zersetzungen auftreten (MIKOLAJCZAK et al. 1970b). Andererseits kann die ^1H -Kernresonanzspektroskopie gut zur quantitativen Bestimmung der Cyanolipide im Gesamtöl herangezogen werden (SEIGLER 1974a). Da Cyanolipide und Glykoside auch verschiedene Detektionsmittel erfordern, war es nicht möglich in einem universellen System beide Substanzklassen zu erfassen.

3.1 Cyanglykoside

3.1.1. Quantitative Bestimmung

Cyanogene Glykoside lassen sich in ungereinigten Pflanzenextrakten nur schwer erfassen. Es ist deshalb sinnvoll, sie indirekt über die enzymatisch oder säurehydrolytisch freisetzbare Blausäure zu bestimmen.

Die freigesetzte Blausäure wird im Gasstrom in eine alkalische Vorlage überführt. Als Trägergas dient ein Inertgas – wir verwendeten Stickstoff –, da hierdurch eine Oxidation der Blausäure durch Luftsauerstoff verhindert wird.

3.1.1.1. Freisetzung der Blausäure

Der einfachste Weg, Cyanglykoside aus Pflanzenmaterial zu bestimmen, ist, Mazerate der zu untersuchenden Organe herzustellen und die spontan freigesetzte Blausäure zu messen. So entwickelten frische Blätter von *C. grandiflorum*, die über Nacht einer Autolyse überlassen wurden, 196 ppm HCN, bezogen auf das Frischgewicht. Allerdings zeigte NAHRSTEDT (1971), daß solche Organmazerate entgegen anders lautenden Literaturangaben (ROSENTHALER 1932; SEIFERT 1955) nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Wir entschlossen uns daher, die cyanogenen Verbindungen zu extrahieren und die Blausäure aus den Extrakten zu bestimmen. Aus den in 2. dargelegten Gründen wurden gefriergetrocknete Organpulver verwendet. Diese wurden zur Entfernung lipophiler Verunreinigungen mit Petroläther vorextrahiert. Im Anschluß daran wurde 3 x je 2 h lang mit Methanol extrahiert. Wie Tabelle 2 zeigt, werden auf diese Weise die Blausäureglykoside nahezu quantitativ erfaßt.

Menstruum	Extraktionszeit	µg HCN	% der Gesamtmenge an HCN
Petroläther	2 h	0,5	0,4
Methanol	4 h	131,0	96,5
	2 h	2,1	1,5
	2 h	0,8	0,6
	2 h	0,7	0,5
	2 h	0,0	-

Tabelle 2: Extraktionszeiten

Versuche, die Blausäureglykoside säurehydrolytisch zu bestimmen führten nicht zum Erfolg. Obwohl Semicarbazid und Dinatriumäthylendiamintetraacetat zugegeben wurden, um Reaktionen der Blausäure mit Aldehyden oder Schwermetallen zu verhindern (NAHRSTEDT 1971), streuten - wahrscheinlich aufgrund von Nebenreaktionen - die erhaltenen Werte stark.

Wir versuchten daraufhin, die Cyanglykoside mit käuflicher β -Glukosidase aus Mandeln zu spalten. Die Versuchsbedingungen wurden wie bei NAHRSTEDT (1971) angegeben gewählt (s.8.3.2.). Doch auch hier konnten wir keine reproduzierten Werte erzielen. Versuche, die β -Glukosidase mit Äthylenglykolmonomethyläther oder niederen Alkoholen wie Methanol zu aktivieren (HÖSEL und NAHRSTEDT 1975), brachte keine Verbesserung der Resultate.

Die natürlichen Substrate der Mandelglukosidase sind Benzaldehydcyanydringlykoside. Im Verlauf dieser Arbeit wurde von SEIGLER et al. (1974b) aus *C. hirsutum* ein Cyanglykosid, Cardiospermin, isoliert (s. auch 5.2.). Da diese Verbindung in ihrer Struktur dem Linamarin, dem natürlichen Substrat der β -Glukosidase Linamarase, ähnlicher ist, testeten wir Enzympräparationen aus Leinsamen. Die Herstellung der Enzympräparationen (s. 8.4.2.) erfolgte nach BUTLER et al. (1965). Aber auch diese Versuche verliefen negativ.

3.1.1.2. β -Glukosidase aus *C. grandiflorum*

Herstellung der Enzympräparation

Wie bei 2. bereits erwähnt, entwickeln Blätter und Sproßachsen von *C. grandiflorum* bei Verletzung spontan Blausäure. Es müssen also neben Cardiospermin auch Enzyme vorhanden sein, die das Blausäureglykosid spalten. Es erschien daher sinnvoll, zur Blausäurebestimmung eine β -Glukosidase-Präparation aus *C. grandiflorum* einzusetzen. Wie Tabelle 3 zeigt, enthalten bis auf die reifen Samen alle Organe von *C. grandiflorum* Blausäureglykoside und entsprechende β -Glukosidasen.

Tabelle 3:
Blausäureentwicklung mazerierter Organproben mit und ohne Zusatz von β -Glukosidase

Organ	ohne β - Glukosidase	mit
Blatt	+	+
Sproßachse	+	+
Wurzel	+	+
Knospe	+	+
Blüte	+	+
Fruchtwand	+	+
Samen (grün)	+	+
Samen (schwarz)	-	+

Extraktion eines Acetontrockenpulvers aus Blättern von *C. grandiflorum* mit McIlvain-Puffer und anschließende Ammoniumsulfat-Fällung führte in allen Fällen zu Präparationen, die gegen Cardiospermin inaktiv waren. Für weitere Versuche setzten wir deshalb Pflanzenrohsäfte ein (s.8.4.1).

Die Aktivität der β -Glukosidase-Präparation wurde gegen Cyrdiospermin als natürliches Substrat und gegen 4-Nitrophenyl- β -D-Glukosid als Standardtestsubstrat für β -Glukosidasen gemessen. Erste Versuche zeigten, daß die so gewonnenen Rohsäfte schnell an Aktivität verloren. Wir setzten deshalb Merkaptoäthanol zu und erzielten damit Präparationen, die bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, etwa eine Woche haltbar waren.

Ein Nachteil der Rohsäfte war, daß sie immer eine deutliche Cyanid-Eigenaktivität zeigten. Gaschromatographisch ließ sich in der Methanolanschüttelung eines gefriergetrockneten Rohsaftes Cardiospermin nachweisen. Da bei unseren Aktivitätsmessungen immer mit Substratüberschuß gearbeitet wurde, konnte die Eigenaktivität außer Betracht gelassen werden. Für quantitative Blausäurebestimmungen allerdings mußte die im Enzympräparat enthaltenen Blausäuremengen durch einen Blindwert berücksichtigt werden.

Eigenschaften der Enzympräparation

Um die β -Glukosidase zur quantitativen Cyanidbestimmung einsetzen zu können, war es wichtig, das pH-Optimum der Enzympräparation zu kennen. Wie Abbildung zeigt, liegen für 4-Nitrophenylglukosid drei und Cardiospermin zwei Maxima vor. Das Optimum der Cardiospermin-Hydrolyse liegt allerdings mit pH 7,13 schon im leicht alkalischen Bereich.

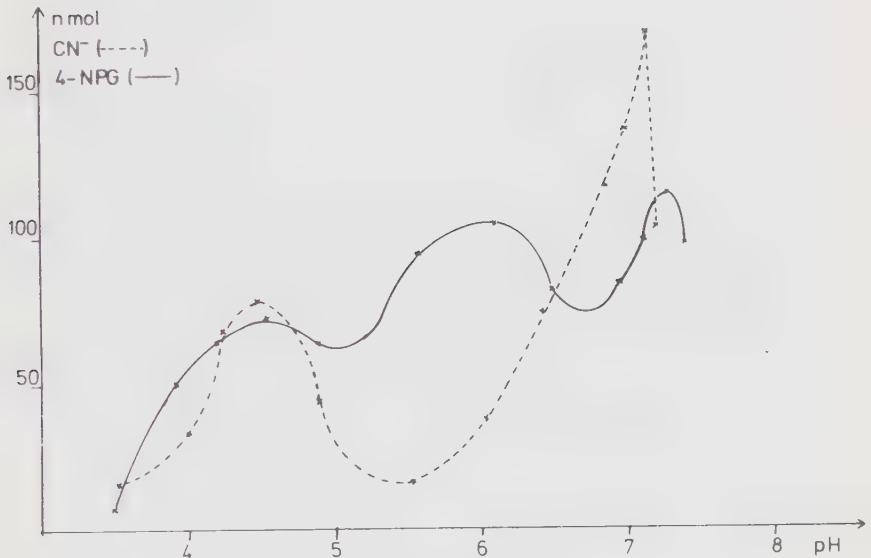


Abbildung 6: pH-Optimum der Enzympräparation
aus *C. grandiflorum*

Der starke Abfall der Kurve zur basischen Seite hin läßt sich damit erklären, daß die Blausäure bei diesem pH überwiegend in ionisierter Form vorliegt und daher nicht mehr quantitativ flüchtig ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, ließen wir eine Kaliumcyanidlösung 15 min lang bei 30°C bei verschiedenen pH-Werten von Stickstoff durchperlen und fingen die übergehende Blausäure in einer alkalischen Vorlage auf. Bei pH 7,39 erhielten wir nur 18 % der Blausäuremenge, die bei einem pH von 4,88 überging.

Dieses Ergebnis und der Befund, daß auch mit Blindwerten die Cyanideigenaktivität der Rohsäfte nur ungenügend kompensiert werden konnte, veranlaßte uns, noch nach anderen Möglichkei-

ten der quantitativen Bestimmung von Cardiospermin zu suchen.

3.1.1.3. Quantitative Hydrolyse der Cyanglykoside aus C. grandiflorum mit Emulsin

Erste Versuche, reines Cardiospermin sowie Cardiospermum-Blattextrakte mit Emulsin (β -Glukosidase reinst, Serva) zu hydrolysieren waren unbefriedigend verlaufen (s.3.1.1.). Wir versuchten nun die Spaltung der Glykoside dadurch zu verbessern, daß bei stark verkleinertem Reaktionsvolumen die Menge an Enzym erhöht wurde. Statt in 500 ml wurde in nur 1 ml inkubiert (s.8.3.3.). Wie Tabelle 4 zeigt, liefert dieses Verfahren reproduzierbare Ergebnisse.

Eingesetzte Menge an Blattextrakt	μ g HCN
1,0 ml	16,3
0,5 ml	8,1
0,2 ml	3,3
0,1 ml	1,6

Tabelle 4: Hydrolyse von Cardio-
spermum-Blattextrakt mit
 β -Glukosidase reinst
(Serva)

3.1.1.4. Quantitative Bestimmung von Blausäure

Zur quantitativen Bestimmung von Blausäure sind eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden (NAHRSTEDT 1971). Wir wählten wegen der hohen Empfindlichkeit und Spezifität, aber auch wegen des geringen apparativen Aufwandes, die Methode nach ALDRIGE (1944) in der Modifikation von KRÖLLER (1968). Die Bestimmung beruht darauf, daß Blausäure mit Brom zu Bromcyan umgesetzt wird, welches mit Pyridin Cyanpyridiniumbromid bildet. Nach Zugabe von primären

Aminen, hier Benzidin*, entsteht ein rotgefärbtes Derivat des Gluthacondialdehyds. Die Konzentration der Blausäure im Ansatz wird durch photometrische Messung bestimmt (s.8.3.4.).

3.12. Dünnschicht- und Papierchromatographie

Blausäureglykoside lassen sich sowohl an Kieselgel- als auch an Cellulosedünnschichten chromatographieren; die Papierchromatographie kann ebenfalls für dieses Trennproblem eingesetzt werden. Übersichten finden sich z.B. bei NAHRSTEDT (1971), LUCKNER (1972) und ABICHT (1976). Die Papierchromatographie wurde in der vorliegenden Arbeit, da sie gegenüber der Chromatographie an Cellulosedünnschichten längere Laufzeiten und schlechtere Trennleistungen bietet, nur für präparative Aufreinigungen von Blausäureglykosiden herangezogen (s.8.7.1.).

Für die qualitative dünnschichtchromatographische Bearbeitung von Cyanglykosiden wurden Kieselgel- und Celluloseschichten verwendet. Bei der routinemäßigen Anwendung nach 6.3.2. wurden aus Kosten- und Zeitgründen der Chromatographie an Kieselgel-DC-Alufolien der Vorzug gegeben. Um die von NAHRSTEDT (1971) beobachteten Isomerisierungen zu vermeiden, wurden keine alkalischen Fließmittel verwendet. Die benutzten stationären und mobilen Phasen sind unter 8.8.1. aufgeführt.

Zur Detektion von Blausäureglykosiden auf Dünnschicht- und Papierchromatogrammen stehen eine Reihe von mehr oder weniger spezifischen Methoden zur Verfügung. Sehr spezifisch und daher gut geeignet ist die Detektion der enzymatisch freigesetzten Blausäure. Hierbei erfolgt die Hydrolyse entweder auf dem intakten Chromatogramm oder aber in besonderen

*Benzidin ist seit geraumer Zeit als Carcinogen bekannt (BORNEFF 1973); nachdem geeignete Austauschstoffe zur Verfügung stehen (GARNER et al. 1976; NAHRSTEDT 1977) sollte diese Substanz nicht mehr verwendet werden.

Reaktionsgefäßen nach Zerschneiden oder Ablösen der Schicht. Zur Detektion der intakten Chromatogramme bedient man sich zweckmäßigerweise eines "Sandwich-Verfahrens", bei dem die Schicht nach Besprühen mit Enzymlösung mit einem Reagenzpapier bedeckt wird (TANTISEWIE et al. 1969). Zur Detektion der freigesetzten Blausäure läßt sich neben dem Guinard-Mirande-Test (GIBBS 1974), der auf der Umsetzung von Cyanwasserstoff mit Pikrinsäure beruht, die Reaktion nach FEIGL und ANGER (1966) heranziehen, bei der in Gegenwart von Blausäure und Kupferäthylacetat das blaugefärbte Oxidationsprodukt des 4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan entsteht. Desweiteren läßt sich das von BENNET und TAPPER (1968) vorgeschlagene Verfahren in der Modifikation nach NAHRSTEDT (1970b) anwenden. Hierbei wird nach der von GUILBAULT und KRAMER (1966) beschriebenen Reaktion die Bildung von 2-Nitrophenylhydrazin aus 4-Nitrobenzaldehyd und 1,2-Dinitrobenzol durch Cyanid katalysiert. Diese Detektion versagt allerdings auf Kieselgelschichten. Ausgekratzte Zonen von Dünnschicht bzw. einzelne Abschnitte von Papierchromatogrammen werden in kleinen Schnappdeckelgläschen mit Enzymlösung versetzt. Die freiwerdende Blausäure wird durch eingehängtes Reagenzpapier - Feigl-Anger- oder Pikratpapier - nachgewiesen (s. 8.7.4.). An allgemeinen Detektionsreagenzien kommen für Kieselgelschichten Anisaldehyd/ H_2SO_4 und Vanillin/ H_2SO_4 in Frage, für Celluloseschichten und Papier eignet sich Benzidin/Trichloressigsäure, wobei auf die Gefährlichkeit des Benzidins hingewiesen werden soll (s. auch 3.2.). Aromatische Blausäureglykoside lassen sich nach SCHWARZMAIER (1975) stoffspezifisch nachweisen. Eine Übersicht über die Detektionssysteme gibt ABICHT (1976).

3.1.3. Qualitative Gaschromatographie

Mono- und polymere Zucker wie auch einfache Glykoside sind nicht unzersetzt flüchtig. Durch geeignete Derivatisierung läßt sich die Flüchtigkeit dieser Verbindung aber soweit erhöhen, daß sie der Chromatographie in der Gasphase zugänglich werden. Hierfür kommt neben der Permethylierung und Peracetylierung insbesondere die Umsetzung zu Trimethylsilyläthern (TMS-Äthern) infrage (SWEELY et al. 1963; PIERCE 1968; BISSET et al. 1969; NAHRSTEDT 1970a, 1971, 1972).

Für unsere Versuche wählten wir die Umsetzung zu TMS-Äthern, die sich besonders schnell und ohne großen Aufwand durchführen läßt. Die Umsetzung der Glykoside erfolgte nach SWEELEY et al. (1963) mit Hexamethyldisilazan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TMCS). Als Trennphasen wurden temperaturstabile Silicongummen verwendet. Die besten Ergebnisse lieferte OV 1 (Methylsilicon), das auch zu quantitativen Bestimmungen eingesetzt wurde. Weitere Versuche erfolgten an OV 17 (Phenylmethylsilicon) und OV 225 (Cyanomethylsilicon) als schwach- bis mittelpolare Phasen.

Als Detektor wurde der Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt, der sich durch Stabilität und hohe Empfindlichkeit auszeichnet.

3.1.4. Quantitative Gaschromatographie

Die Gaschromatographie läßt sich gut zu quantitativen Messungen heranziehen, wenn einige Voraussetzungen erfüllt sind. So muß eine eventuelle nötige Derivatisierung quantitativ und chemisch eindeutig verlaufen. Die während der Säulenpassage auftretenden Substanzverluste müssen reproduzierbar sein. Das Detektionssystem muß hinreichende Linearität aufweisen (KAISER 1965).

Mit den üblichen Silylierungsmitteln lassen sich neben anderen Naturstoffen (SWEELEY et al. 1963; PIERCE 1969) auch Cyanglykoside quantitativ derivatisieren (NAHRSTEDT 1971). Die so erhaltenen Tetramethylsilyläther weisen die nötige Stabilität auf und auch der verwendete Flammenionisationsdetektor zeichnet sich durch hohe Linearität aus (KAISER 1965).

Zur Bestimmung der Signalflächen nennt die Literatur neben der elektronischen Integration, die uns nicht zur Verfügung

stand, eine Vielzahl von Schnellmethoden, wie Wiegen der ausgeschnittenen Signalflächen oder Auswerten über Näherungsformeln wie Höhe x Breite oder Retentionszeit x Höhe (KAISER 1965; JENZSCH 1975). Wir zogen demgegenüber das Auswerten mittels Handplanimeter vor (s.8.11.2.). Dabei kann der Fehler bei Flächen über 100 mm² durch mehrmaliges Planimetrieren unter 5 % gehalten werden (JANAK 1960).

Die Auswertung der Flächenintegrale erfolgte mittels innerem Standard. Dieses Verfahren besitzt den Vorzug, daß Fehler eliminiert werden, die durch ungenaues Dosieren, nicht exakt reproduzierbare Trennbedingungen sowie Substanzverluste auf der Trennsäule entstehen (KAISER 1965). Für jede zu messende Substanz muß zuvor experimentell ein Korrekturfaktor bestimmt werden.

Als inneren Standard wählten wir Triphenylbenzol (TPB), das auch von NAHRSTEDT (1971) zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Cyanglykosiden verwendet worden war. Der Standardkorrekturfaktor für Cardiospermin wurde aus neun verschiedenen Ansätzen von TMS-Glykosid und TPB bestimmt (s.8.11.2.). Nach KAISER (1965) ergibt sich daraus folgender Korrekturfaktor sowie die folgende Näherungsstandardabweichung:

$$f_{\text{Cardiospermin}} = 0,83; s = \pm 0,03 \hat{=} 3,6 \%$$

Bei nicht exakt getrennten Signalen wurde in Übereinstimmung mit KAISER und Klier (1969) und KAISER (1965) die Basislinie mit der Hand korrigiert. Es handelte sich jedoch bei störenden Signalen durchweg um flächenmäßig unbedeutende Peaks.

3.2. Cyanolipide

3.2.1. Quantitative Bestimmung

Da die Cyanolipide ähnlich wie die Cyanogenen Glykoside bei Hydrolyse mit Säuren oder Alkali Blausäure frei-

setzten, wurde-jedoch ohne Erfolg-versucht, diese Reaktion zur Ausführung quantitativer Bestimmungen einzusetzen. Auch Versuche diese Körper enzymatisch mit Lipasen oder Esterasen zu spalten führten nicht zum Erfolg. Daher wurde zur quantitativen Bestimmung die ^1H -Kernresonanzspektroskopie herangezogen (s. auch 3.9.). Die Auswertung erfolgte über die Integrale der Protonensignale mit einer chemischen Verschiebung gegenüber dem inneren Standard TMS von $\delta = 4,12$ ppm für die Protonen der beiden endständigen Kohlenstoffatome des Glycerins.

3.2.2. Dünnschichtchromatographie

Lipide werden an nicht imprägnierten Kieselgelschichten vorwiegend nach Polarität getrennt. Kettenlänge und Lage der Doppelbindungen sind für die Trennung von untergeordneter Bedeutung (RANDERATH 1965; STAHL 1967). Bei den cyanogenen Samenölen der Sapindaceen läßt sich dieses Verhalten zur dünn-schichtchromatographischen Fraktionierung in Triglycerid und Cyanolipide heranziehen. Es ermöglicht sowohl Trennungen im analytischen als auch, bei Verwendung von 1 mm dicken Schichten (MIKOLAJCZAK et al. 1970 b), im präparativen Maßstab. Die verwendeten Fließmittel sind unter 8.8.1. aufgeführt.

Zur Trennung von Lipiden lassen sich auch Silbernitrat- oder Paraffin-imprägnierte Schichten verwenden. Für die Auftrennung der Substanzen ist hierbei in erster Linie Zahl und Lagen der Doppelbindungen maßgeblich (RANDERATH 1965; STAHL 1967). GOWRIKUMAR und MANI (1976) trennten die Cyanolipide aus dem Samenöl von *Cardiospermum emarginatus* an silbernitrat-haltigen Kieselgelschichten. Fließmittel war eine Mischung aus Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform und Äthanol.

Die Detektion von Lipiden auf Kieselgeldünnschichtplatten erfolgt auf vielfältige Weise (RANDERATH 1965; STAHL 1967). Wir beschränkten uns auf Verfahren, die keine Zerstörung der chromatographierten Verbindungen hervorrufen. Gut geeignet

sind das Betrachten im Gegenlicht, das Behandeln mit Joddampf sowie das Besprühen mit 2', 7'-Dichlorfluoresceinlösung (KUNDU und BANDYOPADHYAY 1969; KUNDU 1970; MIKO-LAJCZAK et al 1970a).

3.2.3. Säulenchromatographie

Lipophile Substanzen lassen sich an polaren Sorbentien wie Aluminiumoxid, Kieselgel u.ä. fraktionieren (RANDE-RATH 1965). Die Säulenchromatographie findet bei der Aufreinigung größerer Extraktmengen Anwendung. Als Fließmittel dienen Mischungen wenig polarer Flüssigkeiten, wie Hexan oder chlorierte Kohlenwasserstoffe. Auch zur Abtrennung von Cyanolipiden aus Samenölen wurde die Säulenchromatographie eingesetzt (SEIGLER et al. 1971). Um reine Fraktionen zu erhalten mußte jedoch in jedem Fall ein weiterer Reinigungsschritt wie z.B. präparative Dünnschichtchromatographie angeschlossen werden. Da mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie auch Mengen im 100-mg-Maßstab getrennt werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit weitgehend auf den Einsatz von Säulenchromatographie zur Auftrennung von Samenölen verzichtet.

Die Detektion der Cyanolipid im Säulenuelat erfolgt entweder durch DC-Test oder aber dadurch, daß den Fraktionen ein aliquoter Teil entnommen und auf Blausäureabgabe geprüft wird (s. 8.3.3.).

3.2.4. Hochdruckflüssigchromatographie

Wie bereits dargelegt (s.3.2.2. und 3.2.3.) werden bei Anwendung der Dünnschicht- und Säulenchromatographie - zumindest bei präparativen Trennungen - die Grenzen der Methode nach unseren Erfahrungen schon bei der Fraktionierung von Samenölen in Cyanolipide und Triglyceride erreicht. Eine Trennung der Cyanolipide anhand der verschiedenen Fettsäurereste schien auf diese Weise nur unter Schwierigkeiten möglich. Als leistungsfähige Methode bot sich die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) an, zumal die Gaschromatographie

Compound	Methyl	Vinyl	AB	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---CH---} \end{array}$	$\text{---CH}_2\text{---O---}$	Cyanohydrin
Glycerides	-	Triplet cent. at 5.4 in fatty acids	-	5.4*	Pair of Quartets cent. at 4.12	-
Cyanolipids						
Type I	1.97	5.17 5.3*	-	-	-	5.79
Type II	-	5.61 5.4*	4.58	-	-	5.88
Type III	1.96	5.2*	4.73	-	-	-
Type IV	-	5.2*	4.88 4.68	-	-	-

All chemical shifts are reported in delta values relative to TMS.

*Indicates the peak overlaps fatty acid vinyl absorptions.

Tabelle 5: NMR-Signale von Cyanolipiden nach SEIGLER (1974a).

Die Bezifferung der Cyanolipide erfolgte wie bei Abbildung 2.

wegen nicht ausreichender Temperaturstabilität der Cyanolipide für präparatives Arbeiten nicht eingesetzt werden konnte (MIKOLAJCZAK et al. 1970b).

Das derzeit in der Praxis am häufigsten verwendete System der HPLC ist die Chromatographie in der Umkehrphase. Die Vorteile gegenüber der Adsorptionschromatographie an Kieselgel liegen vor allem in der guten Reproduzierbarkeit und der problemlosen Regeneration der verwendeten Trennsäule (ENGELHARDT 1977). Auch die Trennung von Lipiden läßt sich an stationären Phasen dieser Art durchführen (ENGELHARDT 1977; PEI et al. 1975).

Zur Detektion von Lipiden steht, sofern die Verbindungen nicht UV-aktiv sind, nur der Refraktationsindex-Detektor (RI) zur Verfügung.

Die von einem Schreiber aufgezeichneten Chromatogramme können durch Integration der Signale quantitativ ausgewertet werden. Voraussetzung für die Anwendung der 100 %-Methode ist aber, daß die einzelnen Komponenten einen annähernd gleichen Brechungsindex aufweisen.

3.2.5. ^1H -Kernresonanzspektroskopie von Cyanolipiden

Die Protonenresonanzspektroskopie stellt eine wichtige Methode zur quantitativen und qualitativen Erfassung der Cyanolipide dar. Anhand von charakteristischen chemischen Verschiebungen, die von SEIGLER (1974a) in einer Tabelle zusammengefaßt wurden, können die in einem Öl vorhandenen Cyanolipide nach dem Typ ihrer Nitrilkomponente klassifiziert werden (s. auch Abbildung 2). Durch Integration der typischen Protonensignale und Vergleich mit Signalen, die dem Glycerinanteil der Triglyceride entstammen, sind auch quantitative Aussagen möglich.

4. DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN AUS HETERODENDRON OLEAEFOLIUM DESF.

4.1. Pflanzenmaterial

Für unsere Untersuchungen an *H. oleae-folium* Desf. wurden sowohl generative Pflanzenteile - Blätter und Zweigholz - als auch Samen verwendet. Das gesamte Material wurde aus Australien bezogen, die Bezugsquellen sind unter 8.1.1. aufgeführt. Die Identifizierung der verwendeten Organe erfolgte nach RADL-KOFER (1934), bei den Samen wurden auch Vergleichsmuster herangezogen, die wir von der City Parks Administration, Canberra, Australien, erhalten hatten.

Blätter und Zweigholz waren bereits am Ursprungsort getrocknet worden, so daß es nicht möglich ist, exakte Angaben über den Gehalt an Blausäureglykosiden im genuinen Zustand zu machen. Allerdings läßt der Gerbstoffgehalt der Blätter geringere Trocknungsverluste erwarten als bei *Cardiospermum*-Blättern, in denen keine Gerbstoffe nachgewiesen werden konnten. Hydrolyseversuche ergaben, daß in den Blättern von *H. oleae-folium* keine funktionsfähigen β -Glukosidasen vorhanden waren. Gewebemazerate entwickelten Blausäure erst nach Zusatz von Emulsin.



Abbildung 7: Samen und Blätter von *H. oleae-folium*

4.2. Die cyanogenen Glykoside aus *H. oleaefolium*

4.2.1. Isolierung der Glykoside

Blätter und Zweigholz wurden gepulvert und mit Petroläther und Methanol extrahiert (s. 8.2.1.). Die lipophilen Auszüge zeigten keine Cyanogenese (s. 8.5.) und wurden deshalb verworfen. Die vereinigten Methanolauszüge hingegen waren auf Zusatz von Emulsin deutlich cyanogen. Sie wurden säulenchromatographisch an Polyamid, Kieselgel und Cellulose aufgereinigt (s. 8.8.2.). Anschließende Papierchromatographie ergab zwei cyanidaktive Banden, die mit Methanol eluiert und nach Einengen am Vakuumrotationsverdampfer und Aufnehmen in Wasser über wenig Kohle filtriert wurden. Die farblosen Filtrate ergaben nach Gefriertrocknung weiße, hygroskopische, nicht kristalline Substanzen.

4.2.2. Strukturaufklärung

Die polarere der beiden Verbindungen (s. 4.2.1.) zeigte bei Gaschromatographie an Silikonphasen (s. 8.11.1.) gleiches Verhalten wie aus *C. grandiflorum* isoliertes Cardiospermin (s. 5.2.1.). Auch die mit Cellulose und Kieselgel als stationären Phasen ermittelten Daten waren identisch (s. 8.8.1.). Desgleichen ergeben sich identische ^1H -Kernresonanzspektren (Tab. 10).

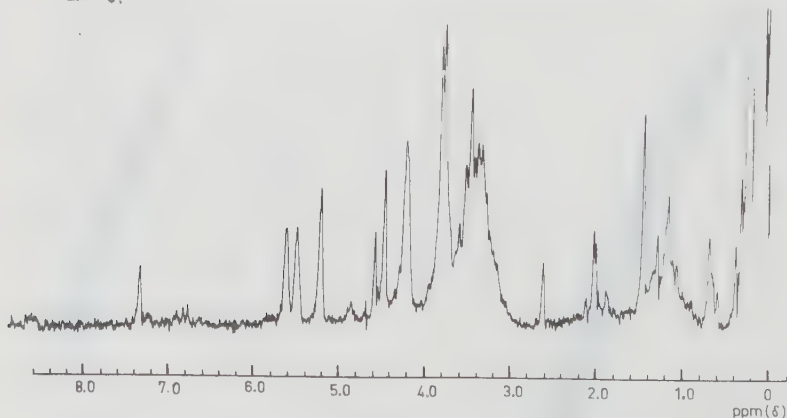


Abbildung 8: 60 MHz ^1H -NMR-Spektrum von TMS-Cardiospermin aus *H. oleaefolium* in Chloroform- d_1 . Chemische Verschiebungen auf TMS als inneren Standard bezogen.

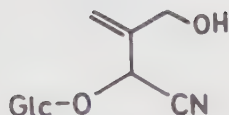


Abbildung 9: Cardiospermin

Die zweite Substanz war in allen oben verwendeten chromatographischen Systemen einheitlich. Das IR-Spektrum (KBr-Preßling s. 8.21.) war dem des Linamarins (SEIGLER 1977a) ähnlich. Es wies Banden auf bei $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ (s, OH-Schwingung), 2900 cm^{-1} (m, C-H-Schwingung), 1140 cm^{-1} (s, Ätherschwingung) und 880 cm^{-1} (w) auf (s. auch Abb. 9). Bemerkenswert ist das Fehlen einer Nitrilbande im Bereich von 2200 cm^{-1} . Dieser Befund spricht für ein gesättigtes α -oxygeniertes Nitril (BELLAMY 1966). Eine osmotrische Molekulargewichtsbestimmung ergab eine Molmasse von 263,7 (s.8.20.). Die Substanz ließ sich mit α -Glukosidase nicht hydrolysieren, setzte aber bei Behandeln mit β -Glukosidase Blausäure frei (s. 8.8.3.).

Zur Ermittlung des Zuckeranteils wurden einige Milligramm der Substanz mit HCl hydrolysiert. Dünnschichtchromatographie an Kieselgel ergab Glukose als einzige Zuckerkomponente (s. 8.6.). Dieser Befund wurde gaschromatographisch an ECNSS-M (BJÖRNDAL et al. 1970) bestätigt (s.8.14.).

Wie bereits unter 1.2. erwähnt, lassen sich Cyanglykoside durch Hydrolyse mit Säuren oder β -Glukosidasen zum korrespondierenden Carbonyl, Blausäure und Zucker abbauen. Nach Spaltung des Glykosides mit β -Glukosidase reinst (SERVA) konnte in der Pentanausschüttelung gaschromatographisch an FFAP durch Additionsanalyse 2-Methylpropanal nachgewiesen werden. Eine Bestätigung des gaschromatographischen Befundes wurde durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel erbracht. Da niedere Aldehyde nur unter Schwierigkeiten

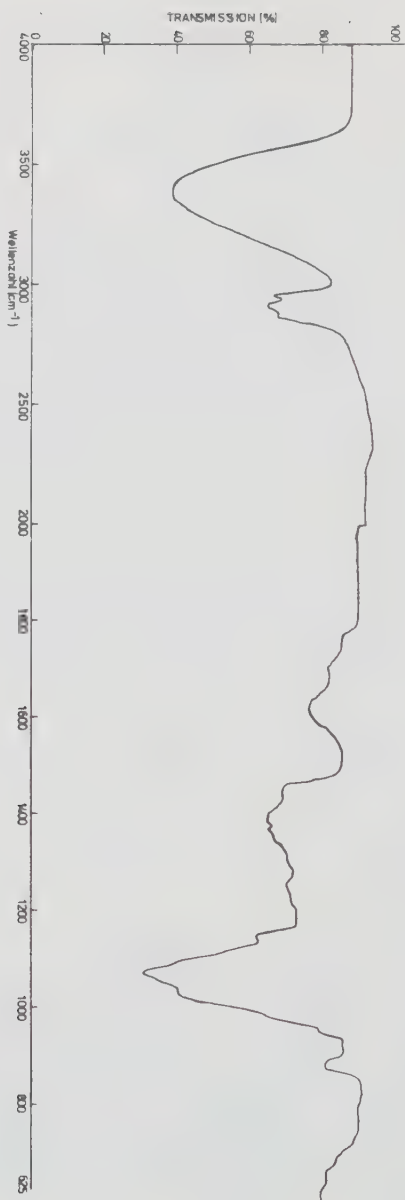


Abbildung 10: IR-Spektrum von Heterodendrin

Lösungsmittel	Cyanhydrinproton	anomeres Glukose- proton	restliche Zucker- protonen	C ₂ -Proton	Methylprotonen	
Methanol-d ₄ *	4,68 s 1 H	4,475 d 1 H J = 7 Hz	3,98-3,1 m 6 H	2,08 (zentr.) m 6 H	1,075 d 3 H	1,10 d 3 H
Dimethylsulf- oxid-d ₆ *	4,7 s 1 H	4,35 d 1 H J = 7 Hz	3,8-3,1 m 6 H	1,95 (zentr.) m 1 H	1,0 s 3 H	0,9 s 3 H
Tetrachlor- kohlenstoff**	4,52 s 1 H	4,32 d 1 H J = 7 Hz	3,9-3,1 m 6 H	2,0 (zentr.) m 1 H	1,2 d 3 H	1,03 d 3 H

*Underivatisiert

** TMS-Äther

Tabelle 6: ¹H-NMR-Daten für Heterodendrin; Chemische Verschiebungen in δ (ppm).

der Dünnschichtchromatographie zugänglich sind, wurden die erhaltenen Carbonylkomponente zum 2,4-Dinitrophenylhydrazon (2,4-DNPH) umgesetzt. Diese Derivate lassen sich an Kieselgelschichten mit guten Ergebnissen trennen (RANDERATH 1965). Ein Teil des Hydrolyseansatzes wurde daher mit 2,4-DNPH-Reagenz versetzt; nach Ausschütteln mit Benzol ließ sich in drei dünnschichtchromatographischen Systemen das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des 2-Methylpropanals identifizieren (2.8.9.).

Die angeführten Daten lassen sich nur dahingehend interpretieren, daß es sich bei der isolierten Substanz um ein in 2-Stellung glukosidiertes 3-Methylbutyronitril handelt. Zur Sicherung dieser Vermutung wurden ^1H -Kernresonanzspektren in Dimethylsulfoxid- d_6 und Methanol- d_4 sowie nach Persilylierung in Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen (s.8.22.).

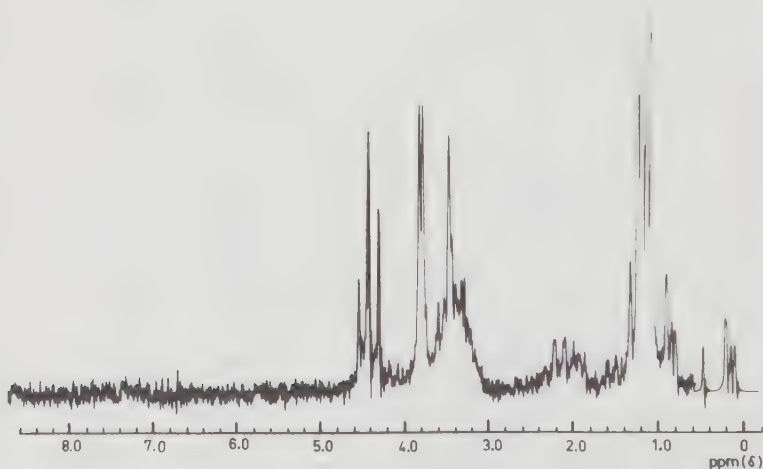


Abbildung 11: 60 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von TMS-Heterodendrin in C Cl_4 . Chemische Verschiebungen auf TMS als inneren Standard bezogen.

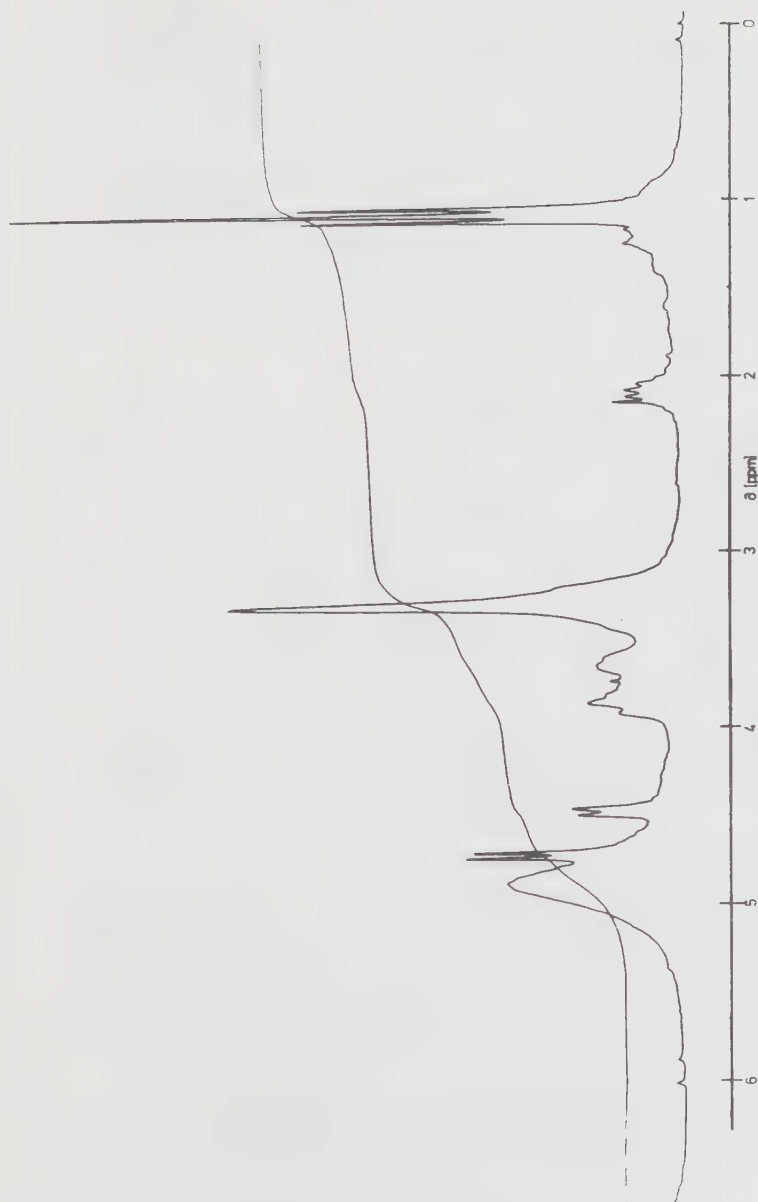


Abbildung 12: 180 MHz FT- ^1H -NMR-Spektrum von Heterodendrin in Methanol- d_4 . Chemische Verschiebungen auf CH_3CD_3 -Signal $\delta = 3,33$ ppm bezogen.

Die Lagen der Glukoseprotonen im ^1H -Kernresonanzspektrum von TMS-Heterodendrin bei $\delta = 3,2$ ppm bis $\delta = 3,8$ ppm, zeigt eine Verschiebung von etwa 0,2 ppm zu tieferem Feld gegenüber Cardiospermin und Proacacipetalin (sensu ETTLINGER, vergl. 4.2.3.).

Das anomere Glukoseproton weist eine chemische Verschiebung von $\delta = 4,37$ ppm auf; dieser Wert liegt im Bereich der entsprechenden Signale von Cardiospermin ($\delta = 4,4$ ppm) und Proacacipetalin ($\delta = 4,37$ ppm). Die Kopplungskonstante beträgt 7 Hz, woraus sich β -Konfiguration des anomeren Glukoseprotons ableiten läßt.

Das Signal des Cyanhydrinprotons ($\delta = 4,30$ ppm) erscheint als Duplett, da hier eine Kopplung mit dem Proton am C-3 des Aglykon vorliegt. Die Resonanzsignale der Cyanhydrinprotonen vergleichbarer Butyronitrilglykoside wie Cardiospermin (SEIGLER und BUTTERFIELD 1974b), Sorbaria-Glykosid (NAHRSTEDT 1976) und Proacacipetalin (ETTLINGER 1977) sind demgegenüber sämtlich zu tieferem Feld verschoben; bedingt durch die dort vorliegende Exomethylengruppe sowie durch die Hydroxylsubstitution der Methylgruppe am C-3 bei Cardiospermin und beim Sorbaria-Glykosid. Bei der vorliegenden Verbindung besteht die entschirmende Umgebung im Wesentlichen aus der Nitrilgruppe und der Zuckerkomponente. Dies erklärt die relativ zu vergleichbaren Glykosiden zu höherem Feld verschobene Resonanzlage des Cyanhydrinprotons.

Das bei $\delta = 1,95$ ppm auftretende Multiplett ist dem Proton am C-3 des Aglykon zuzuordnen, welches mit dem Cyanhydrinproton und denen der beiden Methylgruppen koppelt. Bei Aufnahme des Spektrums der underivatisierten Substanz in Methanol sowie des TMS-Äthers in Tetrachlorkohlenstoff treten zwei Dupletts bei $\delta = 1,10$ ppm und $\delta = 1,07$ ppm bzw. $\delta = 1,2$ ppm und $\delta = 1,0$ ppm auf, die den aufgrund des Diastereotopieeinflusses des chiralen Zentrums am C-2 des Aglykon nicht äquivalenten Methylgruppen zugeord-

net werden können. Wird als Lösungsmittel für die unterivatisierte Verbindung Dimethylsulfoxid verwendet, so erscheinen die Dupletts als zwei verbreiterte, nicht aufgelöste Signale bei $\delta = 0,9$ ppm und $\delta = 1,0$ ppm.

Aus dem Integral der Protonen ergibt sich ein molares Verhältnis von Aglykon zu Zucker von 1 : 1.

Somit läßt sich für das zweite aus *H. oleaefolium* isolierte Cyanglykosid folgende Struktur formulieren.

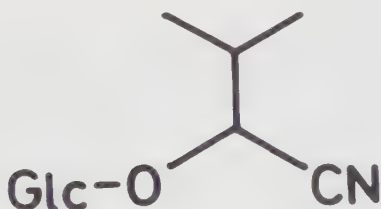


Abbildung 13: Heterodendrin

Als Trivialnamen schlagen wir, der üblichen Nomenklatur folgend, die Bezeichnung "Heterodendrin" vor.

Etwa gleichzeitig mit uns publizierten SEIGLER et al. (1975c) das Vorkommen eines cyanogenen Glykosides mit gleicher Struktur wie Heterodendrin aus *Acacia sieberiana* DC. Die Autoren schlugen die Bezeichnung "Dihydroacacipetalin" als Trivialnamen vor (Zur Nomenklatur der Butyronitrilglykoside s. auch 4.2.3.). Die absolute Konfiguration am C-2 des Aglykon dieser Verbindung wurde nicht geklärt.

4.2.3. Die absolute Konfiguration von Butyronitrilglykosiden

Neben der direkten Bestimmung mit Hilfe von Röntgenbeugungsspektren besteht die Möglichkeit, die absolute Konfiguration einer Substanz über Korrelation mit bekannten Verbindungen

zu ermitteln. Im vorliegenden Fall war die Wahl der Methoden dadurch stark eingeengt, daß nicht kristallines Material in nur geringer Menge zur Verfügung stand.

(S)- und (R)-Formen von Cyanglykosiden weisen Unterschiede in der chemischen Verschiebung des Protonenresonanzsignals für das anomere Glukose- sowie für das Cyanhydrinproton sind aber nur bei Vergleich beider epimerer Formen möglich. Die Festlegung der Konfiguration durch optischen Vergleich scheiterte am Fehlen von stereochemisch eindeutig belegten ähnlichen Verbindungen.

Wie Abbildung 5 zeigt, lassen sich Cyanglykoside auf zwei Wegen abbauen. Während das eine mögliche Reaktionsprodukt, der 2-Methylpropanal kein Asymmetriezentrum mehr aufweist, bleibt bei der Bildung von 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure die sterische Anordnung am C-2 des Aglykon erhalten (KOFOD und EYJOLFSSON 1969). Wegen der geringen Substanzmenge war es nicht möglich, die optische Drehung der entstandenen 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure zu messen und durch Vergleich mit authentischer Substanz die Konfiguration festzulegen.

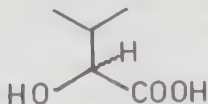


Abbildung 14: 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure

Eine zur Analytik geringer Fettsäuremengen geeignete Methode ist die Gaschromatographie. Enantiomerentrennungen sind auf diesem Wege allerdings nur unter besonderen Bedingungen, etwa an optisch aktiven Phasen, möglich (LOCHMÜLLER und SOUTER 1975). Diastereomere Verbindungen lassen sich dagegen gut trennen. Zur Gaschromatographie von Fettsäuren setzt man häufig deren Ester ein, da diese günstigere chemisch-physikalische Parameter aufweisen.

Es lag daher nahe, die aus Heterodendrin gewonnene 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure mit einem optisch aktiven Alkohol zu verestern und so das Problem auf eine Diastereomerentrennung zu reduzieren. Als optisch reine Alkoholkomponente stand natürliches (-)Methanol zur Verfügung (MIGNAT und PORSCH o.J.). Gaschromatographisch konnte in Modellversuchen racemischer 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure-(-)menthylester an FFAP in zwei isomere Formen aufgetrennt werden (s.8.13.1.).

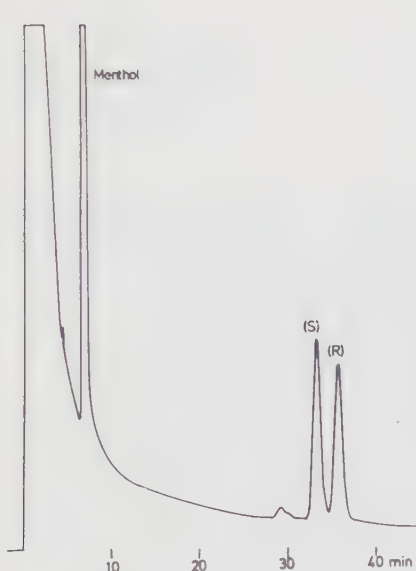


Abbildung 15: GC von racemischem 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure (-)menthylester

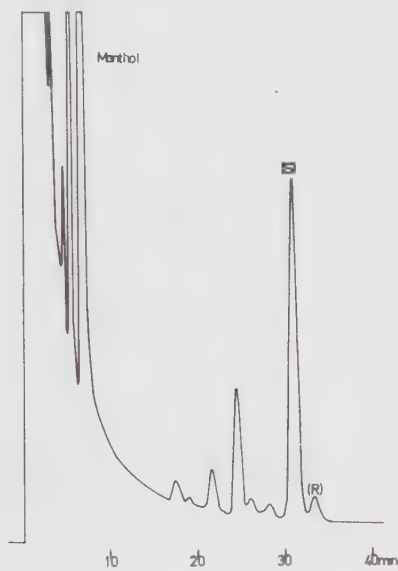


Abbildung 16: GC von 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure-(-)menthylester aus Heterodendrin

Additionsanalysen zeigten bei Vergleich mit aus Heterodendrin gewonnenem 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure-(-)menthylester eine Erhöhung des Signals mit kürzerer Retentionszeit. Vergleiche mit optisch reinem 2(S)-2-Hydroxy-3-methylbuttersäure-(-)menthylester, der aus L-Valin zugänglich ist (FISCHER und SCHEIB-

LER 1908; FREUDENBERG und RHINO 1942), ergaben identische Retentionszeiten für beide Verbindungen. Danach besitzt Heterodendrin (S)-Konfiguration im Asymmetriezentrum des Aglykon (vergl. auch Abbildung 19).

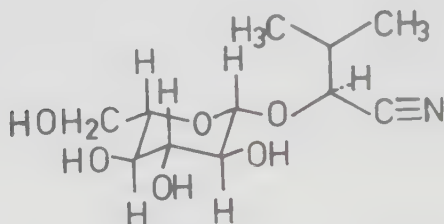


Abbildung 17: (S)-Heterodendrin

Aus den Mimosaceen *Acacia sieberina* var. *woodii* und *A. hebeclada* wurde von STEYN und RIMINGTON (1935; RIMINGTON 1935) ein Cyanglykosid isoliert, dessen Aglykon die Autoren als 2-Hydroxy-3-methylbutyronitril-2-en(I) bezeichneten. In der Folgezeit beschrieben BUTTERFIELD et al. (1975) zwei Cyanglykoside aus *A. sieberiana* var. *woodii*. Die Autoren verworfen die von STEYN und RIMINGTON vorgeschlagene Struktur für Acacipetalin und postulierten stattdessen, daß es sich bei dieser Verbindung um das O- β -D-Glukosid des 2-Hydroxy-3-methylbutyronitril-3-en(18II) handle. Dem zweiten Glykosid, das als "Dihydroacacipetalin" bezeichnet wurde, ordneten sie als Aglykon das 2-Hydroxy-3-methylbutyronitril (III) zu.

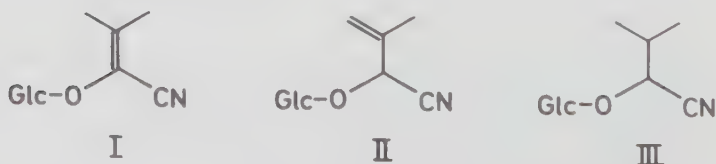


Abbildung 18

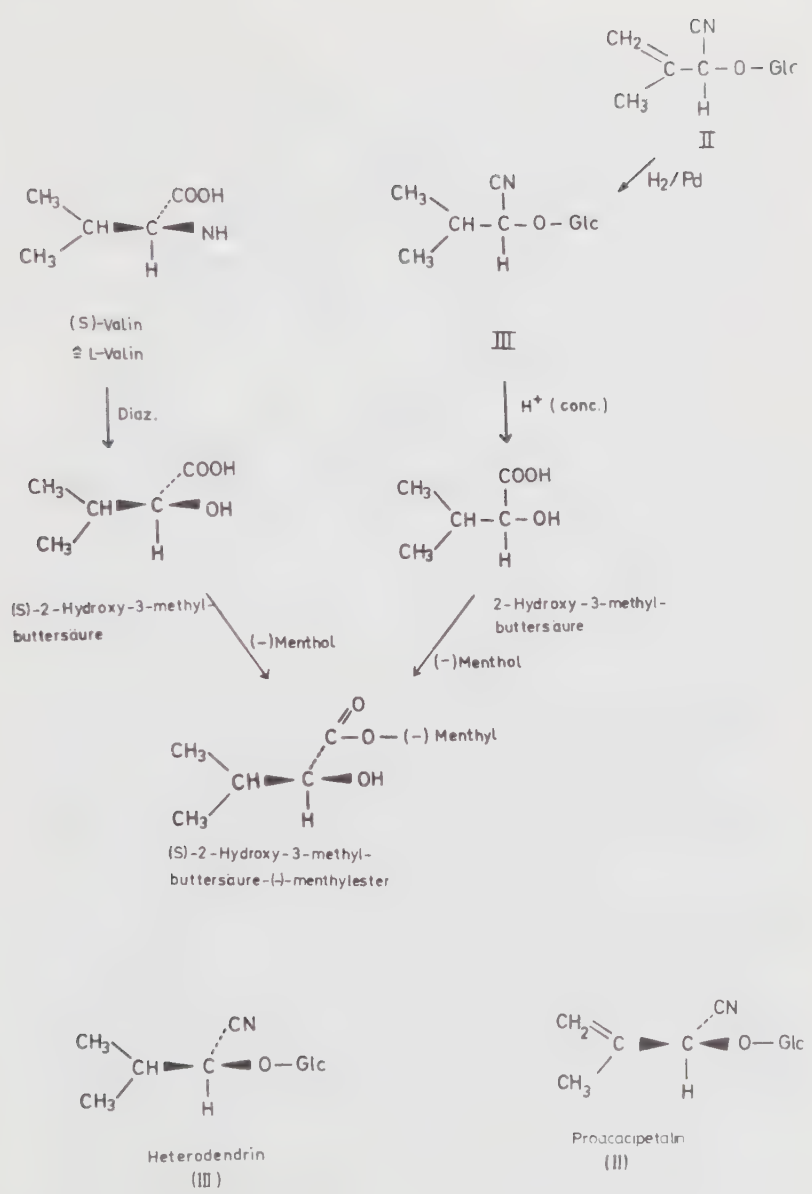


Abbildung 19

Die absolute Konfiguration am C-2 des Aglykon von Acacipetalin (sensu BUTTERFIELD; II) war bislang nicht bekannt. Um das bereits für Heterodendrin erprobte Verfahren zur Lösung dieses Problems einsetzen zu können, war es nötig, die Substanz* unter Konfigurationserhalt in ihr Dihydroprodukt (III) zu überführen**; sie wurde dann der in Abb. 19 angegebenen Reaktionsfolge unterworfen und das entstandene Diastereomere gaschromatographisch identifiziert. Es zeigt sich, daß auch Proacacipetalin (II) am C-2 des Aglykon (S)-Konfiguration aufweist.

Wie bereits in 1.2. dargelegt wurde, erfolgt im Verlauf der Biosynthese von Cyanglykosiden die Hydroxylierung zum Cyanhydrin durch mischfunktionelle Oxygenasen. Da diese Reaktion streng stereospezifisch verläuft, ist es wahrscheinlich, daß auch das natürliche, in *A. sieberiana* vorkommende Dihydroacacipetalin (S)-konfiguriert ist. Demnach müssen also Heterodendrin und Dihydroacacipetalin identisch sein.

Kürzlich wurde das Problem der Struktur von Acacipetalin von ETTLINGER und Mitarbeitern (1977) wieder aufgegriffen. An Hand von Originalsubstanz konnte nachgewiesen werden, daß das Aglykon der von STEYN und RIMINGTON isolierten Substanz entsprechend dem ursprünglichen Strukturvorschlag ein 2-Hydroxy-3-methylbutyronitril-2-en(I) darstellt. Genuin ist allerdings in der Pflanze das von BUTTERFIELD et al. (1975) isolierte 2-Hydroxy-3-methylbutyronitril-3-en-O- β -D-Glukosid (II) enthalten. Durch Behandeln mit Alkali war es jedoch möglich, die genuine Substanz in sowohl in ihr Epimerengemisch als auch in das von STEYN und RIMINGTON isolierte Produkt zu isomerisieren (Abb. 20).

*Proacacipetalin (Abb. 18,II) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E.E. Conn, Davis, California,USA, zur Verfügung gestellt.

** Herrn Prof. Dr. Ch. Rüchardt, Freiburg, sei herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung der Hydrierung gedankt.

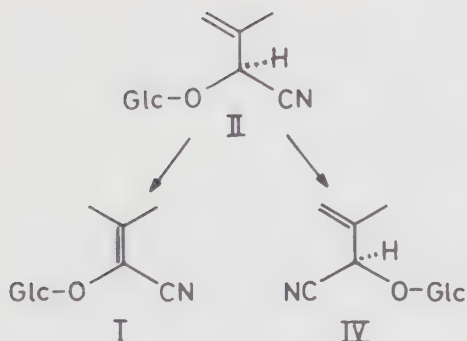


Abbildung 20

ETTLINGER et al. schlagen vor, die Bezeichnung "Acacipetalin" für die von STEYN und RIMINGTON isolierte und beschriebene Substanz (I) beizubehalten, und für die von BUTTERFIELD et al. gefundene Verbindung (II) den Trivialnamen "Proacacipetalin" zu verwenden. In Anlehnung daran soll das epimere, (R)-konfigurierte Proacacipetalin (IV) als "Epi-proacacipetalin" bezeichnet werden.

Folgt man dieser Nomenklatur, so ist die Bezeichnung "Dihydroacacipetalin" nicht mehr eindeutig, da Acacipetalin im Aglykon kein Asymmetriezentrum besitzt. Der vorgeschlagene Trivialname würde sowohl für die (S)- als auch für die (R)-konfigurierte Dihydroverbindung zutreffen. Es erscheint deshalb sinnvoll, für das 2-(S)-2-Hydroxy-3-methylbutyronitril-O-β-D-glukosid die von uns vorgeschlagene Bezeichnung "Heterodendrin" weiter zu verwenden.

4.3. Die Cyanolipide aus *H. oleaefolium*

4.3.1. Isolierung der Cyanolipide

Zur Gewinnung der Cyanolipide wurden die Samen mit Petroläther extrahiert. Nach Einengen am VRV blieb ein leicht gelbgefärbtes Öl mit eigenartigem Geruch zurück. Der Gehalt der Samen an fettem Öl betrug 42 %. Wie schon unter 3.2. ausgeführt wurde, wurden zur Abtrennung der Cyanolipide von den Triglyceriden des Samenöls in der Literatur eine Reihe von chromatographischen Methoden beschrieben. In den meisten Arbeiten bedient man sich dazu der präparativen Dünnschicht- oder der Säulenchromatographie. Als Sorbens dient in beiden Fällen Kieselgel. Dabei können die Cyanolipide vom Typ I und Typ II mit Benzol als Fließmittel, die Typen III und IV mit Hexan/Diäthyläther von den restlichen Bestandteilen des Samenöls abgetrennt werden (MIKOLAJCZAK et al. 1970b; SEIGLER et al. 1974a).

Zur Isolierung der Cyanolipide aus dem vorliegenden Öl wurde dieses über eine Kieselgelsäule chromatographiert (s. 8.8.2.) Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Cyanogenese getestet, die positiven gesammelt und am VRV eingengt. Der Rückstand, ein klares, zähes Öl, wurde an selbstgestrichenen präparativen Kieselgelschichten mit Benzol als Fließmittel chromatographiert. Die erhaltenen Banden wurden ausgekratzt, mit Petroläther vom Sorbens eluiert und auf Cyanogenese geprüft (s. 8.8.3.). Dabei erwies sich die Zone mit dem größeren Rf-Wert als cyanidpositiv. Wurde Hexan/Diäthyläther (s.8.8.1.) als mobile Phase verwendet, so erschien nach Entwickeln der Dünnschichtplatte nur ein Fleck, ein Hinweis darauf, daß es sich bei den Cyanolipiden im Samenöl von *H. oleaefolium* um Cyanhydrine handelt.

4.3.2. Charakterisierung des Cyanolipidtypes

Bisher sind in der Literatur die in Abbildung 2 aufgeführten vier Grundtypen der Cyanolipide beschrieben worden (SEIGLER 1977a; HEGNAUER 1977). Formalchemisch handelt es sich entweder um α,β -ungesättigte Nitrile (Typ III und IV) oder um α -Hydroxynitrile (Typ I und II), die mit einer oder zwei Fettsäuren verestert sind. Je nach "Nichtfett-Anteil" weisen die Verbindungen deutliche Unterschiede in ihrem chemischen und physikalischen Verhalten auf. Die in der Infrarot-Spektroskopie zu beobachtende Nitrilbande bei etwa 2220 cm^{-1} tritt bei α,β -ungesättigten Verbindungen deutlich auf, während sie bei Anwesenheit einer zur Nitrilgruppe α -ständigen Hydroxylgruppe unterdrückt wird (BELLAMY 1966).

Desgleichen sind Unterschiede im chromatographischen Verhalten der Substanzen zu beobachten. Während die Cyanolipide mit Cyanhydrinstruktur sich an Kieselgelschichten mit Benzol als Fließmittel von den restlichen Bestandteilen des Samenöls abtrennen lassen, können die Verbindungen, die als Grundstruktur ein α,β -ungesättigtes Nitril aufweisen, bei Verwendung von Hexan/Diäthyläther als mobiler Phase separiert werden (MIKOLAJCZAK et al. 1970b). Nach Spaltung des Esters entwickeln nur die Cyanhydrine Blausäure (SEIGLER 1977b). Im ^1H -Kernresonanzspektrum weisen die cyanogenen Lipide ein Signal für das Cyanhydrinproton bei $\delta = 5,79$ (Monoester) bzw. bei $\delta = 5,88$ (Diester) auf, das den nicht cyanogenen Cyanolipiden fehlt (SEIGLER 1974a; s.a. Tab. 5.).

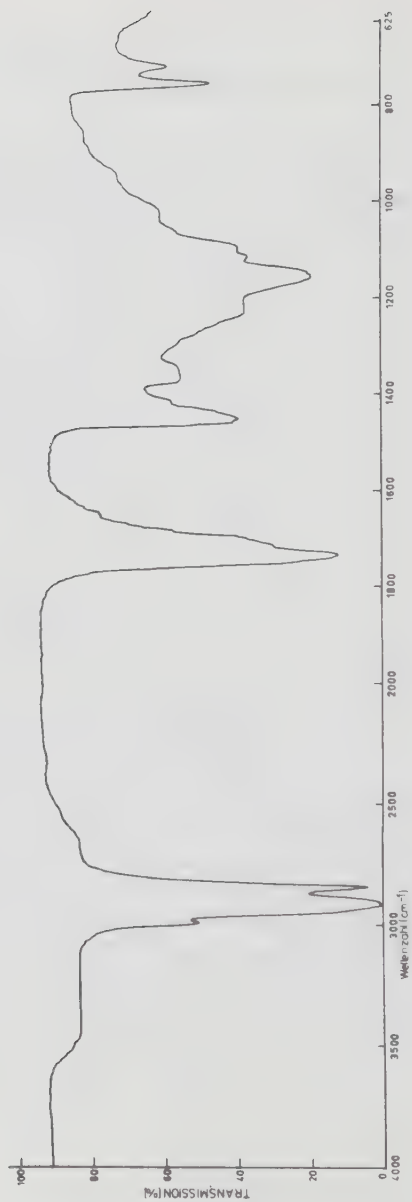


Abbildung 21: Infrarotspektrum des Samenöles von *H. oleae* folium

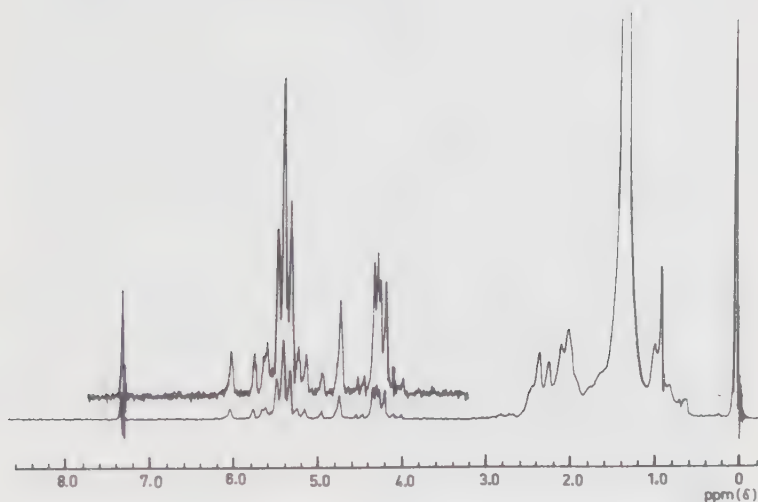


Abbildung 22: 60 MHz ^1H -NMR-Spektrum von *H. oleae* folium Gesamtöl in Chloroform-d_1 . Chemische Verschiebungen auf TMS als inneren Standard bezogen.

Die in 4.3.1. erhaltenen dünnschichtchromatographischen Daten wiesen bereits auf ein Cyanolipid vom Typ der α -Hydroxynitrile hin. Durch infrarotspektroskopische Untersuchung des Gesamtöles konnten α - β -ungesättigte Cyanolipide ausgeschlossen werden (keine Nitril-Absorption bei 2200cm^{-1} , s. Abb. 21), während das ^1H -Protonenresonanzspektrum die für Diester vom Cyanhydrin typ charakteristischen Signale zeigte. Die Cyanhydrinstruktur erklärt auch die nach Esterspaltung zu beobachtende Cyanogenese.

4.3.3. Hochdruckflüssigchromatographie der Cyanolipide

In den bisherigen Arbeiten über Cyanolipide wurden diese nach ihren Nitrilkomponenten klassifiziert und getrennt (MIKOLAJCZAK et al. 1969, 1970a,b,c; MIKOLAJCZAK und SMITH 1971; SEIGLER et al. 1970, 1971; CHARLES et al. 1977). Nach Hydrolyse der Ester erhielten

die Autoren komplexe Fettsäuregemische. Lediglich GOWRI-KUMAR und MANI (1976) trennten ein Estergemisch vom Typ IV an silbernitratimprägnierten Kieselgelschichten über Strukturunterschiede im Säureanteil auf.

Wir versuchten mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie die im Samenöl von *H. oleaefolium* vorhandenen Cyanolipide zu fraktionieren. Zur Trennung wurden die "Reverse-Phase-Chromatographie" herangezogen, die von PEI et al. (1975) zur Trennung von Lipiden eingesetzt worden war. Als Fließmittel erwies sich eine Mischung aus Acetonitril und Methanol als brauchbar (s.8.8.4.). In diesem System konnte das Samenöl von *H. oleaefolium* in zehn Signale zerlegt werden. Die so erhaltenen Fraktionen wurden gesammelt und auf Cyanogenese geprüft. Dabei erwiesen sich Fraktionen vier, fünf und sechs als positiv.

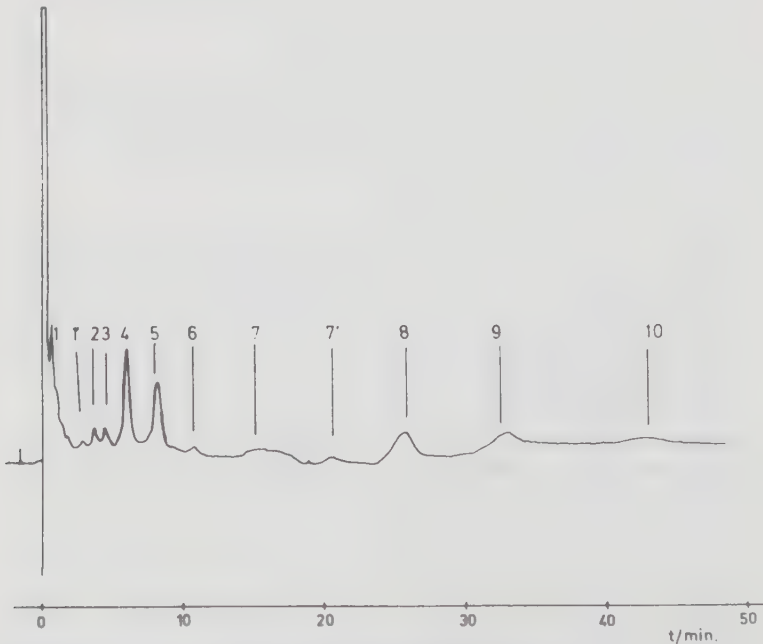


Abbildung 23: Hochdruckflüssigchromatogramm von Heterodendron-Samenöl

Da die Cyanolipide nicht UV-aktiv sind, mußte zur Detektion der Refraktionsindex herangezogen werden. Aus dem Integral der Signalflächen konnte direkt auf das Mengenverhältnis der einzelnen Fraktionen geschlossen werden, da ihre Brechungsindices annähernd gleich waren (s.8.19.). Die Auswertung wurde daher ohne inneren Standard mit Hilfe der 100 %-Methode (KAISER 1965) vorgenommen. Tabelle 7 zeigt die mengenmäßige Verteilung der einzelnen Fraktionen.

<u>HPLC-Signal</u>	<u>Anteil an der cyanogenen Fraktion</u>
4	50,9 %
5	43,6 %
6	5,5 %

Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der Cyanolipide

Die nicht cyanogenen Fraktionen konnten keiner definierten Verbindung zugeordnet werden. Wegen der langen Analysedauer und der damit verbundenen Verbreiterung der spät erscheinenden Triglyceridsignale, war es nicht möglich auch den Anteil der Cyanolipide am Gesamtöl aus dem Hochdruckflüssigchromatogramm zu bestimmen. Statt dessen wurde dieser nach einem Vorschlag von SEIGLER (1974a) aus dem Integral der Protonensignale des ^1H -Kernresonanzspektrums des Gesamtöls ermittelt. Hierbei ergab sich, daß etwa 50 % des Samenöls von *H. oleae-folium* aus Cyanolipiden besteht.

4.3.4. Bestimmung der Fettsäuren

Zur Bestimmung der Fettsäuren, die als Bestandteil der Cyanolipide von *H. oleae-folium* vorkommen, mußten die Ester hydrolysiert werden. Dies erfolgte in Anlehnung an die

Vorschrift des DAB 7 zur Bestimmung der Verseifungszahl (s.8.5.). Die freien Fettsäuren wurden mit Diäthyläther aus dem Reaktionsansatz ausgeschüttelt und nach Umsetzung zum Methyl ester zur gaschromatographischen Analyse an FFAP eingesetzt (s.8.13.2.).

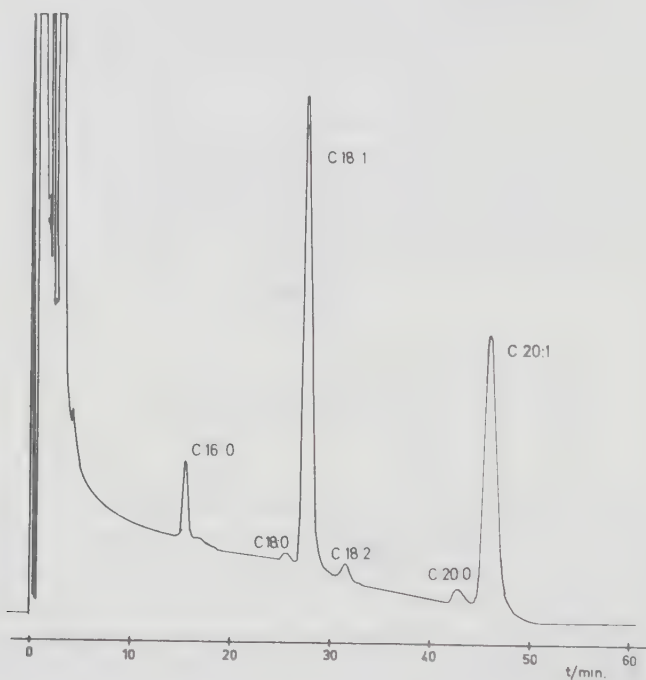


Abbildung 24: Gaschromatogramm der Fettsäuren aus der Cyanolipidfraktion 4 an FFAP

Die Zuordnung der erhaltenen Signale erfolgte durch Additionsanalyse, die quantitative Auswertung mittels der 100 %-Methode. Aufgrund der sehr ähnlichen Molokularstruktur war es nicht nötig, Korrekturfaktoren einzuführen (KAISER 1965). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

HPLC-Signal		C ₁₆		C ₁₈			C ₂₀	
		0	1	0	1	2	0	1
4	Anteil an Signal 4 (%)	4,0	-	1	48,2	1,7	1,3	44,1
	Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	2,0	-	-	24,5	0,9	0,7	22,5
5	Anteil an Signal 5 (%)	2,9	-	1	35,3	1	29,4	32,6
	Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	1,3	-	-	15,4	-	12,8	14,1
6	Anteil an Signal 6 (%)	5,7	-	3,8	41,5	-	20,8	28,3
	Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	0,3	-	0,2	2,3	-	1,1	1,6

Tabelle 8: Verteilung der Fettsäuren in den Cyanolipiden aus dem Samenöl von *H. oleaefolium*

4.4. Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse

In Blättern und Zweigholz von *H. oleaefolium* sind zwei cyano-gene Glykoside mit Butyronitrilstruktur enthalten. Das eine, Cardiospermin, wurde von SEIGLER et al. (1974b) bereits in *C. grandiflorum* gefunden, das zweite, Heterodendrin, wurde unter der Bezeichnung "Dihydroacacipetalin" auch aus Mimosaceen isoliert (BUTTERFIELD et al. 1975). Aufgrund von Arbeiten

von STEYN und RIMINGTON (1935), RIMINGTON (1935), SEIGLER et al. (1975c) und ETTLINGER et al. (1977) sowie der von uns vorgenommenen Aufklärung der Konfiguration am C-2 des Aglykon erscheint aber die Verwendung des Trivialnamens "Heterodendrin" sinnvoller.

Die Butyronitrilglykoside und die Cyanolipide lassen sich biogenetisch von der Aminosäure Leucin ableiten. Für einige Verbindungen dieser Art konnte Leucin bereits als Vorstufe nachgewiesen werden (BUTTERFIELD et al. 1975; SEIGLER und BUTTERFIELD 1976b; SEIGLER und KENNARD 1976c). Während Cyanolipide bislang ausschließlich in Sapindaceen gefunden wurden*, kommen Butyronitrilglykoside in Mimosa-ceen, Sapindaceen und Rosaceen (NAHRSTEDT 1976) vor. Innerhalb der Rosidae verteilt sich die Potenz Leucin zu Cyanoverbindungen zu metabolisieren nach dem derzeitigen Stand des Wissens, also auf die beiden Überordnung Rosanae und Rutanae.

Die in Tabelle 5 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß es trotz Einsatzes der Hochdruckflüssigchromatographie nicht gelang, einheitliche Cyanolipidfraktionen zu erhalten. Die Ergebnisse lassen keine eindeutigen Schlüsse auf die Fettsäureverteilung der Cyanolipide zu. Für die Fraktion 4 läßt sich aber aus den Analysedaten unter Berücksichtigung ihrer Polarität sowie der Trenneigenschaften des "Reverse-Phase" Systemes ableiten, daß die Hauptmenge dieses Signals (88,2 %) die Kombination $C_{18/1} : C_{20/1}$ aufweist. Zudem dürfte als Nebekomponente ein Diester mit der Fettsäureverteilung $C_{18/1} : C_{16/0}$ vorliegen. Schwerer zu interpretieren sind die Verhältnisse bei der Fraktion 5 und 6 des Samenöls. Es liegen offensichtlich beide Male Gemische verschieden veresterter Cyanolipide vor. Für das Signal 5 läßt sich eine Mischung zweier Ester mit den Fettsäurekombinationen $C_{20/1} : C_{20/1}$ und $C_{18/1} : C_{20/0}$ annehmen. Der Fraktion 6 kann die Kombination $C_{20/1} : C_{20/0}$ und $C_{18/1} : C_{18/1}$ zuge-

*Literaturangaben, wonach auch in Boraginaceen Cyanolipide vorkommen, erwiesen sich als Irrtum (SEIGLER 1976d).

ordnet werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt die starke Varianz der Fraktionen auf. Dieser Effekt läßt sich möglicherweise damit erklären, daß sich für jede Fettsäurekombination zwei Substitutionsmuster formulieren lassen; denn die jeweilige Säurekomponente kann entweder mit Hydroxyl am C-2 oder dem am C-4 der Alkoholkomponente verestert sein. Es ist anzunehmen, daß die Fettsäurepositionierung einen deutlichen Einfluß auf die Trennung ausübt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß die erhaltenen Fraktionen Gemische von derartigen Stellungsisomeren darstellen.. Mit den gewählten Methoden ist es allerdings nicht möglich, die Fettsäureposition an der Nitrilkomponente festzustellen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß die verwendeten "Reverse-Phase"-Systeme zwar für eine Vorfraktionierung der Samenöle geeignet sind, während für die Feintrennung selektivere Systeme - etwa Kieselgel - gesucht werden müssen.

Die Hauptmenge der Cyanolipide ist mit Fettsäuren der Kettenlängen $C_{18/1}$ und $C_{20/0}$ verestert. Die Gesamtheit dieser beiden Fettsäuretypen macht mehr als 80 % der Cyanolipidfettsäuren aus. Über das gehäufte Auftreten von C_{20} -Fettsäuren im Samenöl der Sapindaceen und zwar als Bestandteil sowohl der Triglyceride als auch der Cyanolipide wurde in der Literatur verschiedentlich berichtet (HOPKINS und SWINGLE 1968; MIKOLAJCZAK et al. 1970a,b,c; SEIGLER et al. 1970). Einen hohen Gehalt an C_{18} -Fettsäuren - 64,7 % in den Triglyceriden und 49,8 % in den Cyanolipiden - stellten GOWRIKUMAR und MANI (1976) im Samenöl von *C. emarginatus* fest.

Über die Lokalisation der einzelnen Fettsäuren am Nitrilanteil kann keine Aussage gemacht werden, da weder die Separierung in einzelne, reine Cyanolipide gelang, noch wir über eine Methode verfügen, die es erlaubt, selektiv eine Estergruppe zu hydrolysieren. Auch für die Beantwortung der Frage, ob während der Biosynthese dieser Körper an der primären Alkoholgruppe oder am Cyanhydrinhydroxyl selektiv

verestert wird, liegen keine Daten vor. Aus den Befunden läßt sich nur entnehmen, welche Fettsäuren bevorzugt eingebaut werden.

5. DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN AUS CARDIOSPERMUM GRANDIFLORUM SW.

5.1. Pflanzenmaterial

Nach RADLKOFER (1934) wurde die Identität des im Botanischen Garten der Universität Freiburg vorhandenen Exemplars von *C. grandiflorum* überprüft. Um – auch für die in 6. angeführten Untersuchungen der Variation der cyanogenen Verbindungen – über genetisch einheitliches Pflanzenmaterial verfügen zu können, wurden Stecklinge gewonnen und im Gewächshaus kultiviert.

5.2. Die cyanogenen Glykoside aus *C. grandiflorum*

Enzymatische Hydrolyse mit β -Glukosidase von *C. grandiflorum*-Blattextrakten erbrachte höhere Blausäureausbeuten als die saure Hydrolyse (s.2.). Dieser Umstand deutet darauf hin, daß die Blausäure aus glykosidischer Bindung freigesetzt wird. Während unserer Untersuchungen publizierten SEIGLER et al. (1974b) eine Arbeit, nach der in *C. hirsutum* – synonym mit *C. grandiflorum* var. *hirsutum* (RADLKOFER 1934) – ein Blausäureglykosid enthalten ist. Als Trivialnamen schlugen die Autoren die Bezeichnung "Cardiospermin" vor. Die sterische Anordnung der Liganden am Asymetriezentrum des Aglykon blieb ungeklärt.

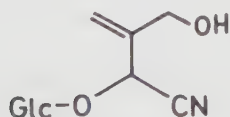


Abbildung 25: Cardiospermin

Dieser Befund sowie eigene Versuche zeigten, daß die Blausäure in den vegetativen Teilen von *C. grandiflorum* aus

Cyanglykosiden stammt. Die quantitativen gaschromatographische Bestimmung von Cardiospermin während einer Vegetationsperiode (s.6.3.) ergab, daß während bestimmter Abschnitte der Vegetationsperiode mindestens noch ein weiteres cyanogenes Glykosid in der Pflanze vorliegen muß, das seinen chromatographischen Daten nach polarer als Cardiospermin ist (vergl. 6.3.3.).

5.2.1. Isolierung der Glykoside

Als Vergleichssubstanz für die Dünnschicht- und Gaschromatographie (s.6.3.) sowie als Referenz für die aus *H. oleaefolium* isolierten Glykoside, war es nötig, authentisches Cardiospermin aus *C. grandiflorum* zu isolieren. Hierzu wurde das Trockenpulver grüner Pflanzenteile extrahiert und mittels Säulen- und Papierchromatographie gereinigt (s.8.7.1. und 8.7.3.). Auch in diesem Fall gelang es nicht, das Glykosid in kristalliner Form zu erhalten. Die Substanz wurde durch ihr ^1H -Kernresonanzspektrum (s.4.2.2.), welches mit den Literaturangaben übereinstimmte (SEIGLER 1974b et al.) identifiziert.

Zur Isolierung des zweiten Cyanglykosides aus *C. grandiflorum* wurde das noch zur Verfügung stehende Trockenmaterial aufgearbeitet. Der Methanolextrakt wurde säulenchromatographisch an Cellulose und präparativ-dünnschichtchromatographischen Kieselgel aufgereinigt. Elution der cyanidaktiven Zonen und Gefriertrocknung ergaben eine weiße, nicht kristalline, hygroskopische Substanz.

5.2.2. Beiträge zur Strukturaufklärung des "polaren Glykosides"

Zur Bestimmung des Zuckeranteils wurde die Substanz in Salzsäure hydrolysiert (s.8.6.). Dünnschichtchromatographie an Kieselgel ergab als einzige Zuckerkomponente Glukose (s.8.10.).

Dieser Befund konnte auch gaschromatographisch an ECNSS - M (BJÖRNDAL et al. 1970) bestätigt werden (s.8.14.).

Die Bestimmung des molaren Verhältnisses von Cyanid zu Glukose (s.8.15.) ergab 1 : 2. Da die isolierte Substanz nach präparativer Aufreinigung an Kieselgeldünnschichten mit Sorbens verunreinigt war und die Begleitstoffe nicht entfernt werden konnten, war es nicht möglich aus dieser Bestimmung auf die Molekularmasse zu schließen. Von ähnlichen Schwierigkeiten nach präparativer Dünnschichtchromatographie von Cyanglykosiden über Kieselgel berichtet ABICHT (1975).

Die vorliegenden Daten ließen keine Rückschlüsse darauf zu, ob es sich bei der vorliegenden Substanz um ein Bidesmosid oder ein Diglykosid handelte. Da bei letzterem während der Hydrolyse intermediär auch das Auftreten eines Disaccharides zu erwarten ist, wurde eine Hydrolysekinetik über 120 min. in 0,1 HCl bei 10°C erstellt. Dünnschichtchromatographische Kontrolle ergab, daß als Hydrolyseprodukte nur Glukose und Cardiospermin auftreten. Cardiospermin ließ sich auch gaschromatographisch im Hydrolyseansatz nachweisen.

Hydrolysezeit	2 min.	5 min.	10 min.	30 min.	60 min.	120 min.
"polares Cyanglykosid"	+++	+++	+	-	-	-
Cardiospermin	-	-	-	+	+	-
Glukose	-	-	-	++	+++	+++
Gentiobiose	-	-	-	-	-	-

Tabelle 9: Hydrolyse von "polaren Cyanglykosid" aus *C. grandiflorum*

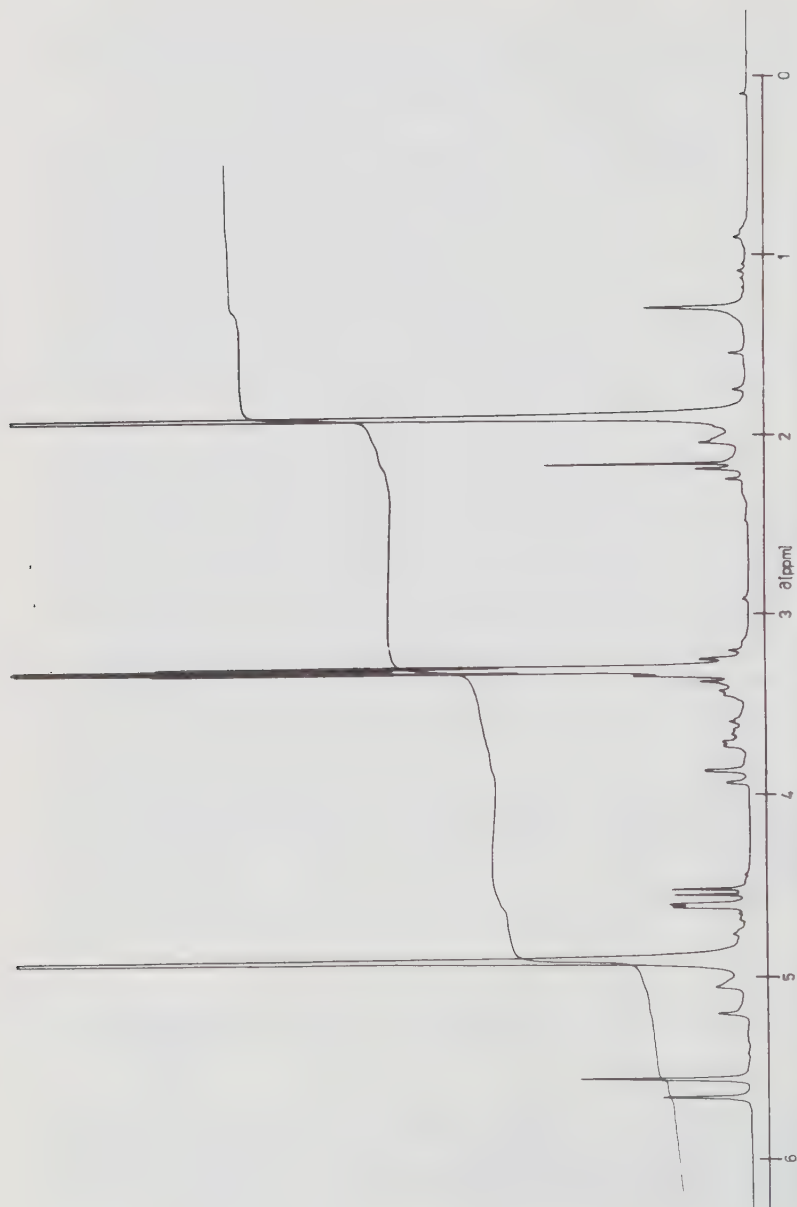


Abbildung 26: 180 MHz FT-NMR-Spektrum des "polaren Cyanglykosides" in Methanol- d_4 . Chemische Verschiebungen auf CH_3OD $\delta = 3,33$ ppm bezogen.

	Cyanhydrinproton	geminale Äthylprotonen	-CH ₂ -OR	anomerisches Glucoseproton	restliche Zuckerprotonen
polares Glykosid*	5,65 s	5,56 d (zentr.)	4,61 d	4,54 s	3,13 - 3,54 m
Cardiospermin*	5,51 s	5,499 d	4,225 d	4,51 s	3,1 - 4,1 m
Sorbaria-Glykosid**	5,55 s	5,65 s	4,9 s	4,65 d	3 - 3,8 m

* 180 MHz FT-NMR-Spektrum in Methanol-d₄. Chemische Verschiebungen bezogen auf

CH₃OD δ = 3,33 ppm.

**60 MHz NMR-Spektrum in Aceton-d₆. Chemische Verschiebungen bezogen auf TMS
als inneren Standard (NAHRSTEDT 1976).

Tabelle 10: ¹H-NMR-Daten von "polares Glykosid", Cardiospermin und Sorbaria-Glykosid

Aufgrund der geringen Glykosidmenge, die zu dem noch Verunreinigungen wie Sorbensreste, Schliffett und andere Substanzen aufwies, konnten - auch mittels Fourier-Transformation - keine zufriedenstellenden ^1H -Kernresonanzspektren aufgenommen werden. Immerhin war es möglich bei in Methanol- d_4 und in schwerem Wasser aufgenommenen Spektren Protonenresonanzen zu beobachten, die denen, die beim Cardiospermin auftreten, ähnlich waren. Auffällig war aber, daß die Protonen der primären Alkoholgruppe im Aglykon deutlich zu tieferem Feld verschoben waren, was auf eine Substitution an dieser Stelle hindeutet. Wie Tabelle 10 zeigt, ist die Verschiebung geringer als die, die beim Sorbaria-Glykosid, eines 4-Hydroxybenzoesäureester des Cardiospermins, auftritt (NAHRSTEDT 1976). Eine Glukosidierung an dieser Stelle würde mit deshalb allen bisher vorliegenden Daten in Einklang stehen.

Die endgültige Sicherung eines Strukturvorschlages war mit der zur Verfügung stehenden Substanzmenge nicht möglich. Da das "polare Cyanglykosid" nicht zu jedem Zeitpunkt der Vegetationsperiode in größeren Mengen auftritt, war eine erneute Isolierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchführbar. Die Strukturaufklärung des "polaren Glykosides" aus *C. grandiflorum* soll aber zu gegebener Zeit weiter verfolgt werden.

5.3. Die Cyanolipide aus *C. grandiflorum*

5.3.1. Isolierung der Cyanolipide

Reife Samen der nach 5.1. angezogenen Pflanzen wurden wie bei 4.3. aufgearbeitet. Der Ölgehalt der Samen betrug 35 %.

5.3.2. Charakterisierung des Cyanolipidtypes

Mittels Infrarotspektroskopie konnte auch im Samenöl von *C. grandiflorum* keine Nitrilbande nachgewiesen werden (Abwesenheit von α, β -ungesättigten Nitrilen, vergl. 4.3.2.).

Auch Dünnschicht- und ^1H -Kernresonanzspektroskopie ergaben, daß die vorliegenden Cyanolipide Diester vom Cyanhydrintyp darstellen. Erwartungsgemäß entwickelten die Verbindungen nach Esterspaltung Blausäure (s.8.8.3.). Diese Befunde stimmen mit den Angaben der Literatur überein (SEIGLER 1976d). Integration der Protonensignale des NMR-Spektrums ergab, daß 50 % des Gesamtöls aus Cyanolipiden bestehen.

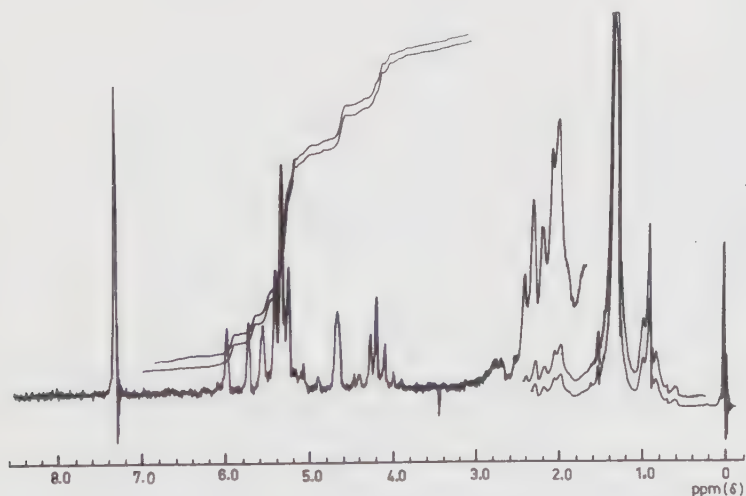


Abbildung 27: 60 MHz ^1H -NMR-Spektrum von *C. grandiflorum* Gesamtöl in Chloroform- d_1 . Chemische Verschiebungen auf TMS als inneren Standard bezogen.

5.3.3. Hochdruckflüssigchromatographie der Cyanolipide

Die Hochdruckflüssigchromatographie erfolgte wie bei 4.3.3.. Auch das Samenöl von *C. grandiflorum* ergab als viertes, fünftes und sechstes Signal cyanogene Fraktionen.

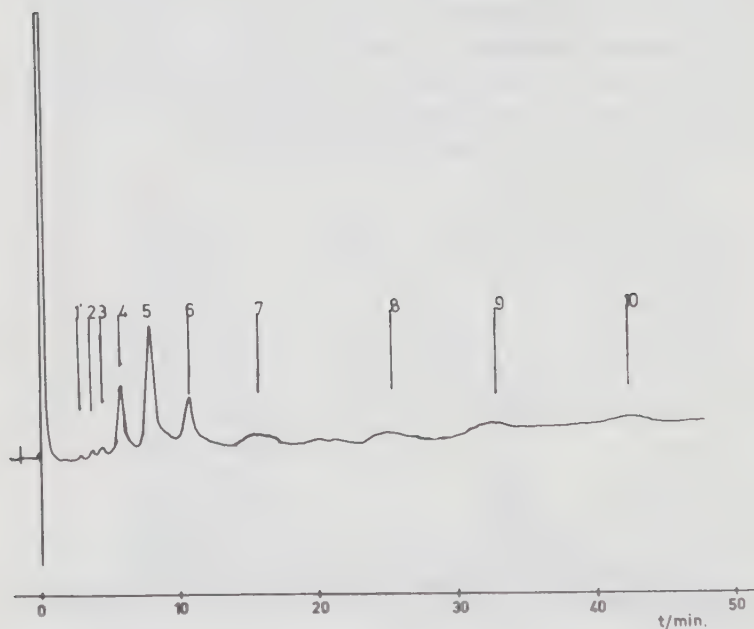


Abbildung 28: Hochdruckflüssigchromatogramm von Cardiospermum-Gesamtöl

5.3.4. Bestimmung der Fettsäuren

Die cyanogenen Fraktionen wurden wie bei 4.3.4. hydrolysiert und die erhaltenen Fettsäuren als Methylester gaschromatographisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

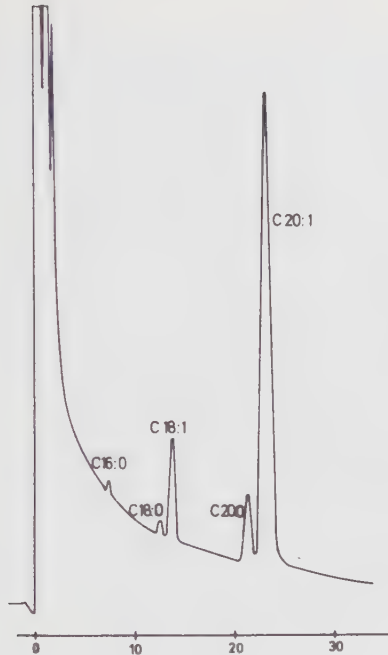


Abbildung 29: Gaschromatogramm der Fettsäuren der Cyanolipidfraktionen 5 an FFAP

5.4. Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse

In den grünen Teilen *C. grandiflorum* lassen sich zwei Cyanglykoside nachweisen. Die Struktur des einen wurde während unserer Arbeit von SEIGLER et al. (1974b) publiziert. Für das andere konnte ein Strukturvorschlag erstellt werden, der aber aufgrund der geringen Menge isolierter Substanz und des zeitlich begrenzten Auftretens dieses Glykosides im Rahmen dieser Arbeit nicht gesichert werden konnte.

Das Samenöl von *C. grandiflorum* enthält – wie bereits in der Literatur angegeben (SEIGLER und KAWAHARA 1976c) – Cyanolipide vom Typ der Cyanhydrindiester. Der Versuch, mit Hilfe der HPLC die Cyanolipide nach ihren Fettsäureanteilen zu fraktionieren, erbrachte wie bei 4.3.3. keine eindeutigen

Ergebnisse. Für die Fraktion 4 kann ein Cyanolipid mit der Fettsäurekombination $C_{18/1} : C_{20/1}$ angenommen werden. Daneben müssen aber noch Cyanolipide mit den Paarungen $C_{20/1} : C_{16/0}$, $C_{20/1} : C_{16/1}$ und $C_{20/1} : C_{18/2}$ vorliegen. Der überwiegende Menge der Fraktion 5 kann die Kombination $C_{20/1} : C_{20/1}$ zugeordnet werden; als Verunreinigung ist ein Cyanolipid mit der Fettsäureverteilung $C_{18/1} : C_{20/0}$ möglich. Die Ergebnisse für die Fraktion 6 können dahingehend interpretiert werden, daß der Hauptanteil die Kombination $C_{20/0} : C_{20/1}$ aufweist. Als nicht unbedeutende Nebenfraktion träte dann noch ein Cyanolipid mit der Fettsäureverteilung $C_{20/1} : C_{18/1}$ auf. Diese Kombination ist allerdings schon der Fraktion 4 zugeordnet worden. Als Erklärung für diese Diskrepanz läßt sich wiederum nur die Möglichkeit der Auftrennung nach den verschiedenen Positionen der Estersäuren anführen. Im übrigen zeigt sich hier wie schon in 4.5. erwähnt, daß das gewählte System zur Trennung von Cyanolipiden nur bedingt brauchbar ist.

HPLC-Signal	Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	C ₁₆			C ₁₈			C ₂₀		
4	21,9	Anteil an Signal 4 (%)	0	1	0	1	2	0	1	
		Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	3,4	2,2	1	37,1	3,4	3,4	50,5	
5	57,5	Anteil an Signal 5 (%)	0,7	0,5	-	8,1	0,7	0,7	11,0	
		Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	1	-	1	9,6	-	7,7	82,7	
6	29,5	Anteil an Signal 6 (%)	2,1	1,4	1,4	9,9	1,4	34,0	49,6	
		Anteil an der Cyanolipidfraktion (%)	0,4	0,3	0,3	2,0	0,3	7,0	10,2	

Tabelle 11: Verteilung der Fettsäuren in den Cyanolipiden des Samenöles von *C. grandiflorum*

6. DIE ONTOGENETISCHE VARIABILITÄT DER CYANOGENEN VER- BINDUNGEN, UNTERSUCHT AN C. GRANDIFLORUM

6.1. Pflanzenmaterial

Für die Untersuchung der Variation der cyanogenen Verbindungen wurden die in 5.1. angeführten Stecklinge verwendet.

Die Untersuchungen erstreckten sich auf Blätter, Sproßachse, Wurzel, Knospen, Blüten und Früchte. Blätter wurden etwa alle 14 Tage geerntet, Wurzeln und Sproßachsen nur einmal im Monat. Da die Pflanzen über längere Zeit hinweg immer wieder neue Blüten bildeten, mußten für die Früchte, im Gegensatz zu den Blättern und Sproßachsenabschnitten, die in zeitlich regelmäßigen Abständen geerntet wurden, andere Kriterien herangezogen werden. Die Erntezeitpunkte wurden daher nach Entwicklungsstadien festgelegt. Als Anhaltspunkte dienten die Größe, der Fortschritt der Sklerifizierung der Fruchtwand und die Färbung des Exokarps. Eine Übersicht über die gesammelten Proben gibt Tabelle 12.

Bei Br0 handelt es sich um junge Blätter, die von den obersten sechs Insertionen stammen. BrM wurden zusammenhängend aus der Mitte der Pflanze entnommen und BrU von den untersten sechs Ansatzstellen. Die Sproßachsen wurden in drei gleichlange Teile geteilt, Sp0, SpM und SpU. Die Wurzel, W, wurde ganz geerntet. Kn und Bn steht für Knospen bzw. Blüten. Die Früchte wurden mit Fr, die Samen mit Sa bezeichnet. Frw steht für Fruchtwand.

Datum	Blätter	Sproßachse	Wurzel	Knospen Blüten Früchte
16.05.75	Br 1	-	-	-
04.06.75	Br 2	Sp 2	W 2	-
13.06.75	Br 3	-	-	-
18.06.75	Br 4	Sp 4	W 4	-
02.07.75	Br 5	-	-	-
14.07.75	Br 6	Sp 6	W 6	-
06.08.75	Br 7	-	-	-
18.08.75	-	-	-	Kn 8
21.08.75	Br 9	Sp 9	W 9	Bn 9
01.09.75	Br 10	-	-	Fr 10
18.09.75	Br 11	Sp 11	W 11	Fr 11
01.10.75	Br 12	-	-	-
16.10.75	Br 13	Sp 13	W 13	Fr 13
20.11.75	Br 14	-	-	Fr 14
02.12.75	Br 15	Sp 15	W 15	-
16.12.75	Br 16	-	-	-
09.01.76	Br 17	Sp 17	W 17	Fr 17
10.02.76	Br 18	Sp 18	W 18	-
12.03.76	Br 19	Sp 19	W 19	-
12.04.76	Br 20	Sp 20	W 20	-

Tabelle 12: Pflanzenmaterial

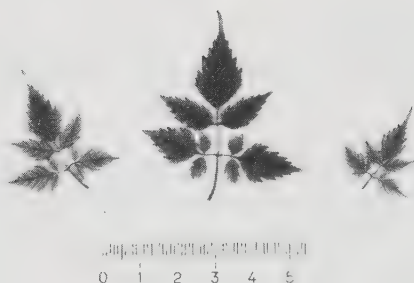


Abbildung 30: Junge Blätter (Br0)

Bei Fr 10 sind die Kapseln etwa so lang wie die anhaftenden Griffelreste, Fr 11 sind kleine, unreife Früchte, bei Fr 12 haben die Kapseln ihre endgültige Größe nahezu erreicht, die Fruchtwände sind aber noch nicht sklerifiziert. Fr 14 sind noch grüne Früchte mit bereits sklerifiziertem Exokarp, Fr 17 schließlich sind ausgereifte, gelbe Früchte. Ab Fr 11 war es möglich, die Früchte in Fruchtwand und Samen zu zerlegen. In der Regel enthielten sie drei, seltener zwei oder einen Samen.

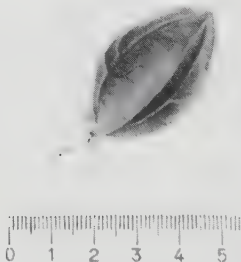


Abbildung 31: Unreife Frucht (Fr 12)

Sa 11 waren etwa stecknadel-, Sa 12 ungefähr streichholzkopfgroß. Sa 14 hatten Erbsengröße, waren aber noch grün;

Sa 17 hingegen waren ausgereift und schwarz. Das Trockengewicht der Samen war bei Sa 14 am größten und fiel demgegenüber bei Sa 17 etwas ab. Abbildung 32 zeigt die Trockengewichte der gesammelten Proben.

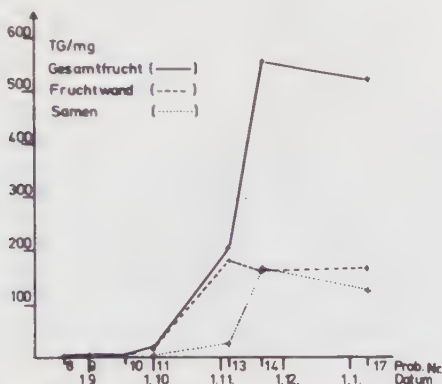


Abbildung 32: Trockengewicht der Samen

6.2. Der Blausäuregehalt von *C. grandiflorum*

6.2.1. Bestimmung der Blausäure aus Cyanglykosiden

Wie bereits ausgeführt (vergl. 2. und 5.) enthalten die vegetativen Organe von *C. grandiflorum* glykosidisch gebundene Blausäure. Aus den in 3.1.1.1. angegebenen Gründen war eine direkte Cyanidbestimmung in den Organmazeraten nicht möglich. Die Proben (s.6.1.) wurden daher extrahiert (s.8.2.3.) und aliquote Menge der Extrakte zur Blausäurebestimmung eingesetzt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse sowohl auf Organ als auch auf Trockengewicht bezogen graphisch dargestellt, wobei bei den Sproßachsenabschnitten statt Organ die Länge des Sproßabschnittes eingesetzt wurde. Zur Problematik der Bezugsgrößen vergleiche PAECH (1956). Die Zahlenwerte finden sich tabellarisch im Anhang (Tabellen 15 bis 24).

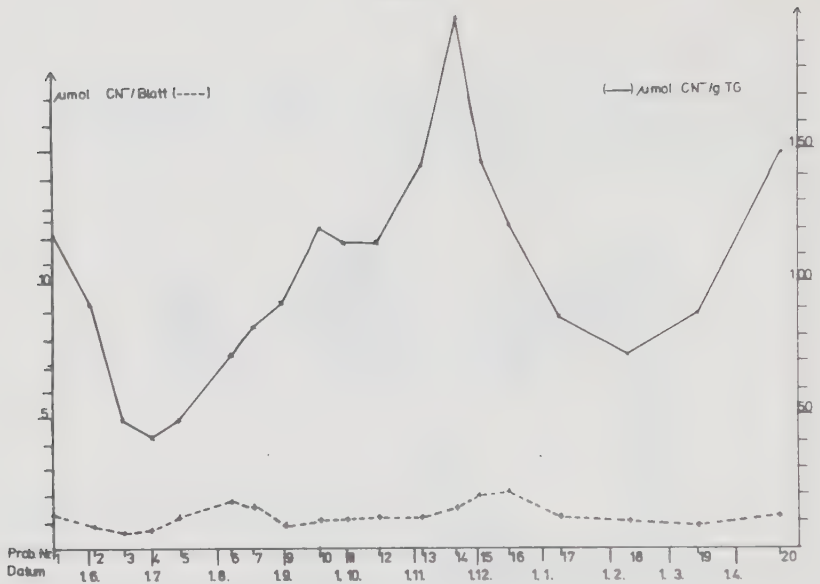


Abbildung 33: Cyanidgehalt von jungen Blättern (Br0)

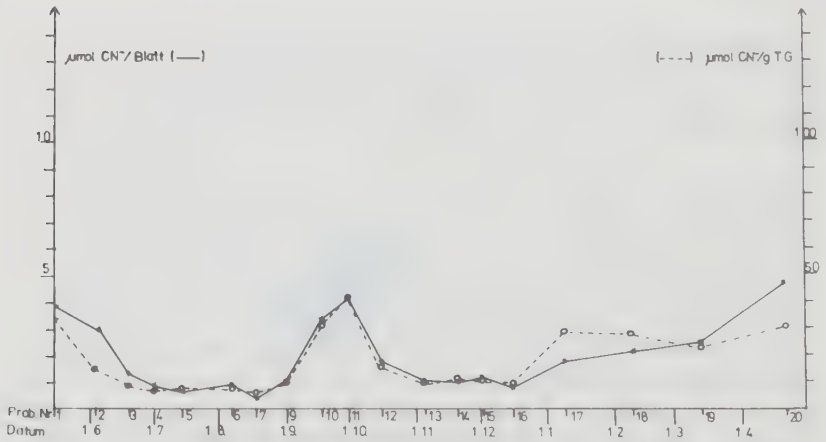


Abbildung 34: Cyanidgehalt von alten Blättern (BrU)

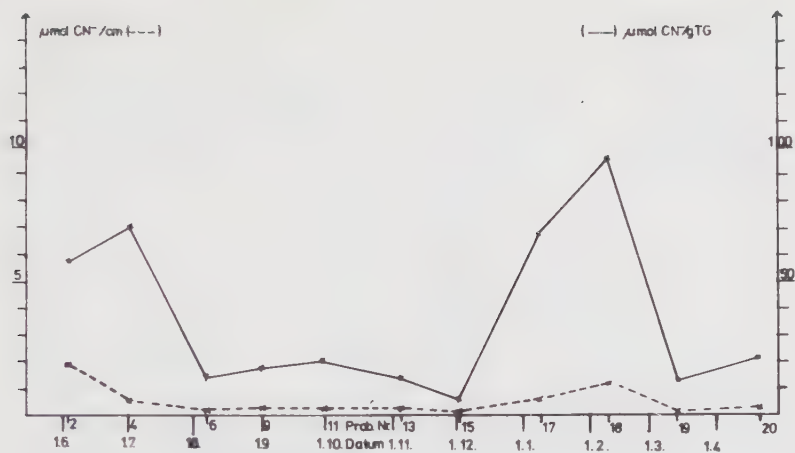


Abbildung 35: Cyanidgehalt des oberen Spößachsenabschnittes (Sp0)

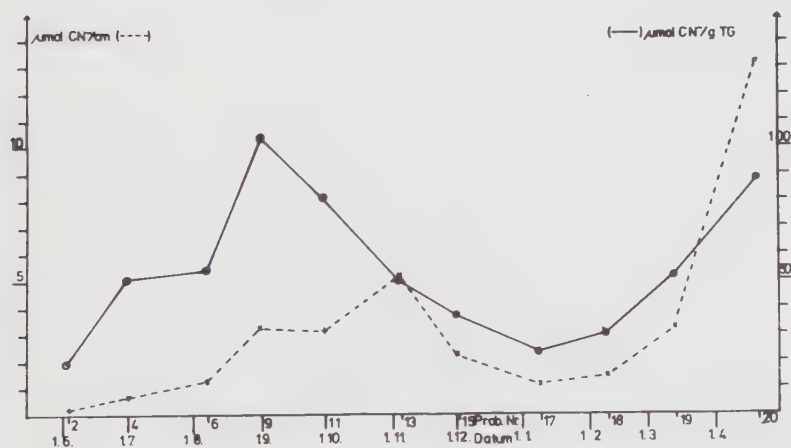


Abbildung 36: Cyanidgehalt des unteren Spößabschnittes (SpU)

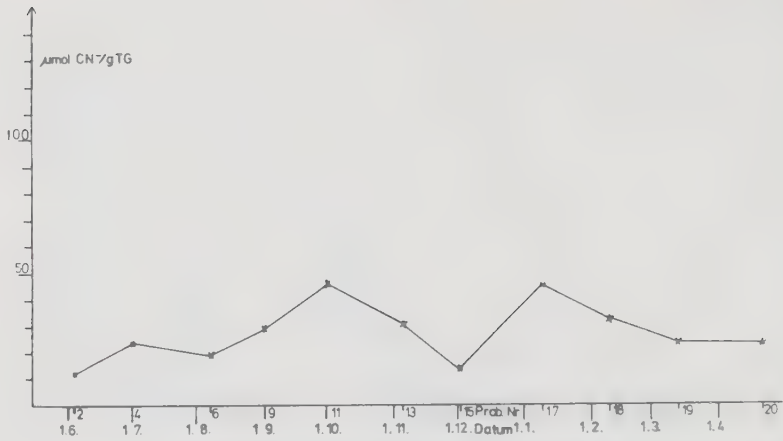


Abbildung 37: Cyanidgehalt der Wurzel

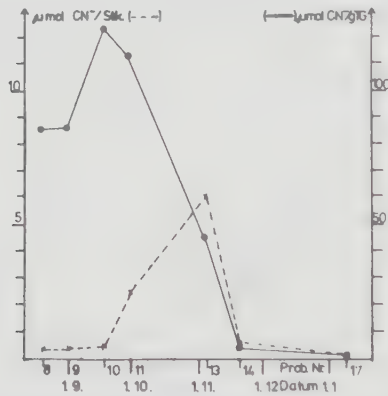


Abbildung 38: Cyanidgehalt von Knospen, Blüten
und Früchten

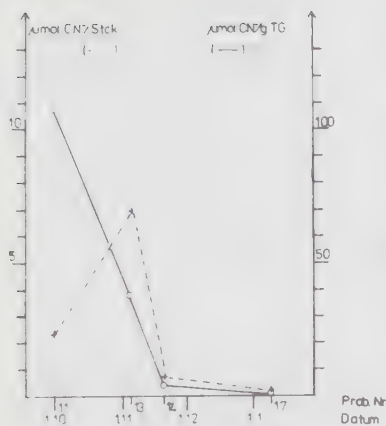


Abbildung 39 : Cyanidgehalt von Fruchtwänden

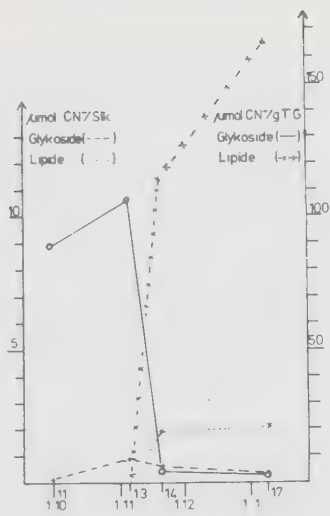


Abbildung 40: Gehalt der Samen an Cyanglykosiden und -lipiden

6.2.2. Quantitative Bestimmung der Cyanolipide

Neben cyanogenen Glykosiden enthält *C. grandiflorum* in den Samen wie bereits in 5.3. erwähnt, Cyanolipide vom Typ der Fettsäurediester mit Cyanhydrinstruktur.

Die Aufarbeitung der Samen erfolgte wie unter 4.3.1. beschrieben. In Vorversuchen war festgestellt worden, daß eine Verlängerung der Extraktionszeit um weitere vier Stunden die Ausbeute an Öl nur 0,1 % erhöht.

Um das Auftreten der Cyanolipide zum frühest möglichen Zeitpunkt zu erfassen, wurden die Petrolätherauszüge der Knospen, Blüten und Früchte zu den Untersuchungen herangezogen. Als cyanogen erwiesen sich nur die Extrakte der Samen.

Die eingeeengten Extrakte waren bei den Proben Fr 10, Sa 11 und Sa 12 deutlich grün gefärbt. Sa 14 und Sa 17 waren hellgelb.

Zur quantitativen Bestimmung der Cyanolipide im Samenöl wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie herangezogen (s.3.2.1.). Im Folgenden sind die Ergebnisse sowohl auf Organ als auch auf Trockengewicht bezogen graphisch dargestellt. Die Zahlenwerte finden sich tabellarisch im Anhang (Tabelle 24). Für die Cyanolipide wurde eine mittlere Summenformel von $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{O}_4\text{N}$ entsprechend einer Molmasse von 670 angenommen. Diesen Wert erhält man, wenn als Säurekomponente je eine Fettsäure vom Typ $\text{C}_{18/1}$ und $\text{C}_{20/0}$ angenommen wird (s.a. 4.4. und 5.5.).

6.2.3. Zusammenfassung und Erläuterung der Ergebnisse

Die in 6.2.1. und 6.2.3. erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß alle untersuchten Organe Cyanglykoside enthalten, die Samen von einem bestimmten Reifestadium an auch Cyanolipide. Bisher war nur bekannt, daß die Blätter von *C. grandiflorum* Blausäureglykoside (HEGNAUER 1973; SEIGLER et al. 1974b)

und das Samenöl Cyanolipide (SEIGLER und KAWAHARA 1976c) führen (s. auch 2.).

Wie unter 6.1. angegeben, wurden von Blättern und Sproßachsen zu jedem Sammeldatum drei verschiedene Proben erhoben. Da das Alter der Blätter vom apikalen zum basalen Teil des Sprosses hin zunimmt, können so Varianten aufgezeigt werden, die - unabhängig vom Alter der Pflanze - durch den Entwicklungsstand der Organe bestimmt sind. Auch ein eventueller Transport der cyanogenen Verbindungen kann anhand dieser Art der Probenentnahme diskutiert werden. Die mittleren Probenanteile wurden, da sie keine signifikanten Aussagen erbrachten, in 6.2.1. nicht aufgeführt. Die Meßwerte sind in den Anhang aufgenommen (Tab. 16 und 19).

Bei Betrachtung der Diagramme der Blätter fällt auf, daß die Kurvenverläufe je nach Bezugsgröße stark differieren. Die Ursache hierfür ist in der Zunahme an Biomasse zu suchen, die das einzelne Organ im Laufe seiner Entwicklung erfährt. Denn trotz gleichbleibender absoluter Menge fällt die Konzentration an "Sekundärstoff" ab, wenn die Zelle verstärkt Biomasse produziert. Es scheint daher vor allem für Blätter, Blüten und Früchte sinnvoll, die Bezugsgröße "Einzelorgan" zu verwenden, um Informationen über die Kinetik der Blausäure in diesen Organen zu gewinnen. Bei den Sproßachsenabschnitten war der Bezug auf das einzelne Organ nicht möglich, wir führten daher die Hilfsgröße "HCN/Längeneinheit" ein (Der Parameter "Volumen" wurde aus Gründen der schnellen Probenentnahme nicht gewählt (s. auch 2.). Der Blausäuregehalt der Wurzel konnte nur in Bezug auf Trockengewicht ausgewertet werden, da eine quantitative Ernte dieses Organs nicht möglich war.

Für die oberen und unteren Sproßachsenabschnitte ergeben sich bei Verwendung beider Bezugsgrößen (Längeneinheit und Trockengewicht) ähnlich verlaufende Kurven. Die Lage der Maxima ist allerdings zeitlich gegeneinander verschoben. Die höchsten Blausäurewerte erhält man im oberen Teil der Sproßachse zu Anfang des Untersuchungszeit-

raumes im Mai sowie zwischen Anfang Januar und Anfang Februar. Der untere Sproßabschnitt hingegen kumuliert Blausäureglykoside vor allem im Oktober und November sowie gegen Ende des Untersuchungszeitraumes im April.

Die Cyanglykosidkonzentration der Wurzel unterliegt geringeren Schwankungen als die des Sprosses. Sie erreicht Anfang Oktober und Anfang Januar die höchsten Werte.

Bezieht man die Blausäurewerte der Blätter auf Trockengewicht, so zeigt sich für die oberen Blätter ein ausgeprägtes Maximum Anfang Dezember. Bei Korrelation mit dem Einzelorgan tritt dazu noch ein weiteres im Juli auf, das offensichtlich durch die Zunahme an Biomasse kompensiert wurde. Die unteren Blätter weisen einen - wenn auch weniger deutlichen - Anstieg im September - Oktober auf. Bei Bezug auf das einzelne Blatt erscheint außerdem noch ein schwacher Anstieg im Januar. Vergleicht man die Blausäurewerte der Blätter mit denen der entsprechenden Sproßachsenabschnitte, so verlaufen für den unteren Teil die Kurven sehr ähnlich. Im oberen Teil treten die Maxima bei Blättern deutlich früher - etwa 4 bis 8 Wochen - auf als bei der Sproßachse. Eine Bildung der Blausäureglykoside in den Blättern und ein Transport in den Sproß - ähnlich wie NAHRSTEDT (1971) dies für die Kirsche diskutierte - läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.

Signifikantere Ergebnisse liefern Blüten und Früchte. Bezieht man die Cyanglykosidkonzentration auf Trockengewicht, so steigt der Gehalt von der Knospe zur jungen Frucht zunächst an, um dann bis zur Fruchtreife stark abzufallen. Doch erscheint es hier wie bei den Blättern sinnvoll, den absoluten Gehalt je Organ zu betrachten: Der Gehalt an Cyanglykosiden steigt bei Beginn der Fruchtentwicklung stark an und fällt dann aber schnell wieder ab. Der Rückgang der Glykosidmenge ist mit einem starken Anstieg der

Cyanolipiden in den Samen gekoppelt.

Der Blausäuregehalt der einzelnen Organe von *C. grandiflorum* ist nicht konstant. Er schwankt bei den oberen Blättern, die den höchsten Blausäuregehalt aufweisen, zwischen 40 und 200 $\mu\text{mol HCN/g}$ Trockengewicht. Die niedrigsten Werte finden sich in den Fruchtwänden, die zwischen 120 und 2 $\mu\text{mol HCN/g}$ Trockengewicht enthalten.

6.3. Quantitative Bestimmung der cyanogenen Glykoside in *C. grandiflorum*

Aus den in 6.2. dargelegten Ergebnissen muß gefolgert werden, daß die detektierte Blausäure aus Cyanglykosiden stammt. Eine Aussage darüber, ob neben Cardiospermin noch andere Cyanglykoside in der Pflanze vorliegen, kann aufgrund dieser Ergebnisse nicht gemacht werden.

Es war daher erforderlich, Cardiospermin in den Extrakten direkt zu bestimmen. Zwar hatten eigene Voruntersuchungen im Gegensatz zu SEIGLER et al. (1974b), die das Vorkommen einer zweiten unbekannten Verbindung in *C. grandiflorum* var. *hirsutum* aufgrund von dünnschichtchromatographischen Daten postulieren nur Cardiospermin erbracht; es ist aber nicht ungewöhnlich, daß Verbindungen des Sekundärstoffwechsels nur zu bestimmten Zeiten oder in bestimmten Organen einer Species auftreten. Für die Cyanglykoside weisen SEIGLER (1975a) und HEGNAUER (1977) ausdrücklich auf diese Möglichkeit hin.

Die Kontrolle der Blausäureherkunft mußte also alle Organe und die gesamte Vegetationsperiode umfassen. Als Methoden kamen vor allem die Dünnschicht- und die Gaschromatographie in Frage (s.3.1.). Während die Dünnschichtchromatographie zur qualitativen Aussage herangezogen wurde, setzten wir die Gaschromatographie zur quantitativen Kontrolle der nach 6.2.1. erhaltenen Ergebnisse ein.

6.3.1. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

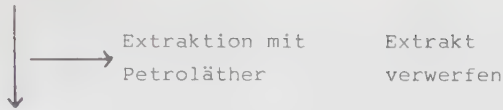
Die nach 5.2.1. gewonnenen Extrakte enthielten, trotz Abtrennung des größten Teils der lipophilen Verbindungen durch Vorextraktion mit Petroläther, noch erhebliche Mengen an Verunreinigungen, insbesondere phenolische Verbindungen, Chlorophylle und Kohlenhydrate. Ein direkter Einsatz dieser Extrakte war weder für die Dünnschicht- noch für die Gaschromatographie möglich, vielmehr mußten weitere Reinigungsschritte angeschlossen werden.

Dazu boten sich chromatographische Verfahren, insbesondere die Säulenchromatographie an. Als Sorbentien finden in der Literatur für diesen Zweck Kieselgel, Cellulose, Aktivkohle, Polyvinylpyrrolidon sowie Polyamid Verwendung (WOOD 1966; REAY 1969; KOFOD et al. 1969; EYJOLFSSON 1970; BENNET 1970; SEIGLER 1974b; ABICHT 1976).

NAHRSTEDT (1971) erzielte bei der Aufreinigung von Benzaldehydcyanhydrinmono- und -diglykosiden aus *Prunus avium* gute Ergebnisse mit einer Kombination von Polyamid- und Cellulose-trockensäulen.

Vorversuche zeigten allerdings, das dieses Verfahren auf das vorliegende Problem nicht ohne weiteres übertragen werden konnte. Zum einen erwies sich das Lösen oder Suspendieren eines vom Methanol befreiten Trockenextraktes im Wasser als schwierig, zum anderen wies das Eluat der Polyamidsäure pH-Werte von etwa 9 - 10 auf. Da Cyanglykoside isomerisierten (NAHRSTEDT 1975a) und auch die glykosidische Bindung gegen hohe pH-Werte nicht beständig ist, wurden die wäßrigen Extrakte mit Essigsäure auf einen pH von etwa 3 eingestellt. Die Polyamideluat überstiegen daraufhin einen pH von 7,5 nicht mehr. Eine säurehydrolytische Spaltung der Cyanglykoside ließ sich auch nach vierstündigem Stehen in der essigsauren Lösung nicht nachweisen.

Trockenpulver



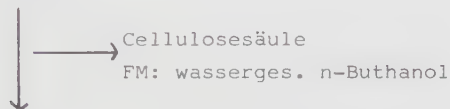
Rückstand



Extrakt



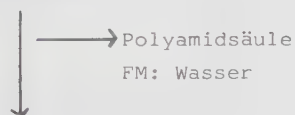
Rückstand



Eluat



Rückstand



Eluat



Rückstand



Abbildung 1: Schema des Aufarbeitungsganges

Um Schwierigkeiten bei der Herstellung der wäßrigen Rohextraktsuspension und Verluste von Cyanglykosiden durch Einschluß in unlösliche Partikel zu vermeiden, wurde der zu untersuchende aliquote methanolische Extraktanteil direkt auf Cellulose aufgezogen und über eine mit diesem Sorbens gefüllte Trockensäule chromatographiert (s.8.8.2.). Hierbei wurden der größte Anteil der Kohlenhydrate entfernt, die Pigmente jedoch, insbesondere Chlorophylle, die die Säule mit der Fließmittelfront durchwanderten, gerieten quantitativ ins Eluat. Dieses wurde nach Entfernen des Butanols und Aufnehmen in Wasser angesäuert und zur Chromatographie an Pbyamid verwendet (s.8.8.2.). Der so aufgereinigte Extrakt wurde zur Dünnschicht- und Gaschromatographie eingesetzt. Abbildung 42 zeigt ein Schema des Aufarbeitungsganges (vergl. auch 8.2.4.).

6.3.2. Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Kontrolle wurden aliquote Teile der Extrakte, die den in Abbildung 41 dargestellten Aufarbeitungsgang durchlaufen hatten, an Kieselgelschichten chromatographiert. Die Detektion erfolgte mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 (s.8.7.4.). Unter den angegebenen Bedingungen konnte in allen Fällen als einziges Cyanglykosid nur Cardiospermin nachgewiesen werden.

6.3.3. Quantitative gaschromatographische Bestimmung von Cardiospermin

Wie eingangs bereits erwähnt, sollte mit Hilfe der quantitativen Gaschromatographie festgestellt werden, ob die in 6.2.1. erfaßte Blausäure vollständig aus Cardiospermin stammt.

Die gaschromatographische Bestimmung des Cardiospermins wurde bei Blättern, Sproßabschnitten und Wurzeln an ausgewählten Proben durchgeführt. Knospen, Blüten, Früchte, Fruchtwände und Samen wurden vollständig überprüft. In der Regel wurden 1 g Trockensubstanz je Probe eingesetzt, bei

Proben mit sehr hohen oder niedrigen Blausäurekonzentrationen entsprechend mehr oder weniger. Sofern die Glykosidmengen es zuließen, wurden die Extrakte am Ende des Aufarbeitungsganges geteilt und je eine Hälfte zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung und zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Als Trennphase für die Gaschromatographie wurde, wie unter 3.1.3. bereits erwähnt, OV 1 eingesetzt.

Das in Abbildung 41 angegebene Aufarbeitungsschema wurde durch konstante Sorbens- und Fließmittelmengen standardisiert (s.8.2.4.). In Modellversuchen wurde der Verlust an Cardiospermin während der Aufarbeitung bestimmt. Die Wiederfindung lag bei 71,34 % $s = \pm 1,04 \hat{=} 1,46$ %.

Die quantitative Auswertung der Peakflächen auf Cardiospermin ergab besonders bei einigen Blattproben deutliche Minderwerte. Da sowohl Blausäurebestimmung als auch quantitative Gaschromatographie in Modellversuchen getestet worden waren, mußte angenommen werden, daß neben Cardiospermin in den vegetativen Organen von *C. grandiflorum* noch andere cyanogene Verbindungen enthalten sind. Da diese Substanzen offensichtlich von der enzymatischen Cyanidbestimmung erfaßt werden (s.6.2.1.) war anzunehmen, daß es sich ebenfalls um Blausäureglykoside handelt.

Dünnschichtchromatographische Kontrollen dieser Extrakte nach Durchlaufen des Aufarbeitungsganges (s.8.2.4.) hatten nur Cardiospermin ergeben. Blausäurebestimmungen dagegen, die mit aufgereinigten Extrakten durchgeführt wurden, bestätigten die gaschromatographisch erhaltenen Glykosidwerte. Die unbekannte cyanogene Substanz war demnach offenbar im Laufe des Aufreinigungsganges entfernt worden.

Daraufhin wurden die Proben bei denen das Glykosid/Cyanidmißverhältnis aufgetreten war, überprüft. Die Volumina der Säuleneluate (s. 8.2.4.) sowohl für die Cellulose- als auch für die Polyamid-Phase wurden verdoppelt, die Cellulose säule zusätzlich noch mit einem Säulenvolumen Wasser eluiert. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Säulen-

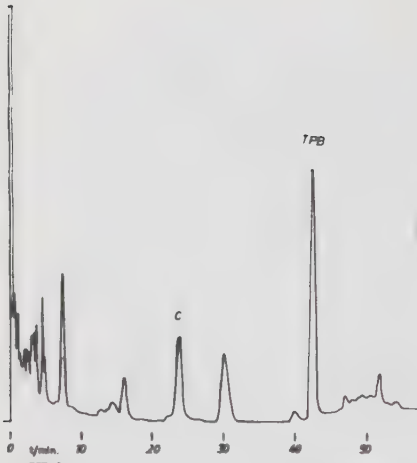


Abb. 42: Gaschromatogramm
eines Blattextraktes (BrU 3)

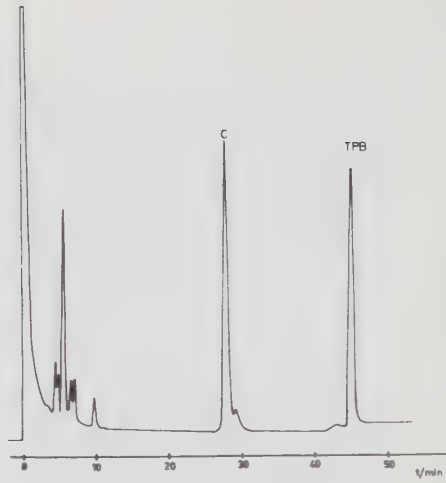


Abb. 43: Gaschromatogramm
eines Sproßextraktes (SpO 17)

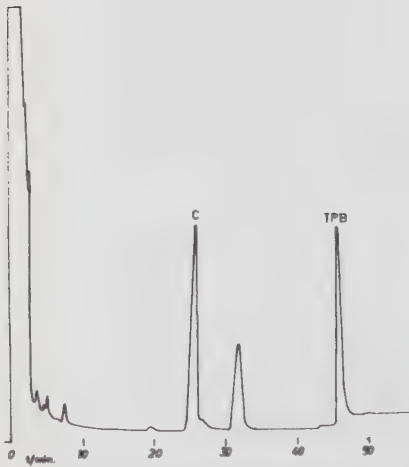


Abb. 44: Gaschromatogramm
eines Fruchtextraktes (Fr I)

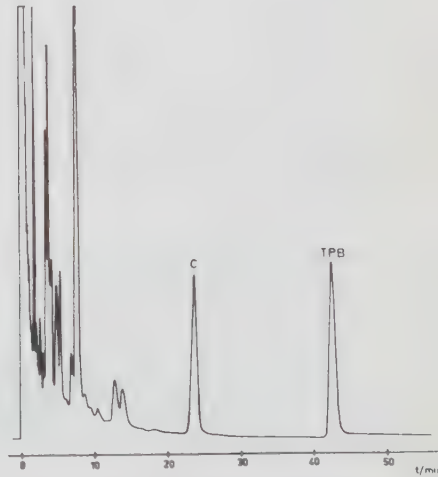


Abb. 45: Gaschromatogramm
eines Samenextraktes (Sa III)

- ' -

eluat unter Einsatz cyanidspezifischer Detektionsmittel (.8.7.4.) ergab nur eine weitere cyanogene Substanz. Diese konnte in allen Proben von Wurzeln und unteren Blättern nachgewiesen werden. In den oberen Blättern fehlte sie in der Zeit zwischen Mitte September und Anfang Dezember. In der Sproßachse trat sie nur am Anfang und Ende des gewählten Untersuchungszeitraumes von Juni bis August und dann wieder ab März/April auf. Die Knospen enthielten nur Cardiospermin, in Blüten und Früchten fanden sich dann wieder beide Cyanglykoside, wobei in den ausgereiften Früchten das unbekannte Glykosid nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel erwies sich die unbekannte Substanz als polarer als Cardiospermin, auch an Polyamid wurde sie stärker zurückgehalten. Sie wird deshalb im Folgenden und in 5. als "polares Glykosid" bezeichnet.

6.3.4. Die Verteilung der Cyanglykoside in einzelnen Organen von C. grandiflorum im Verlauf einer Vegetationsperiode

Das "polare Cyanglykosid" aus C. grandiflorum war – auch als TMS-Äther – der quantitativen Gaschromatographie nicht zugänglich. Indirekt läßt sich das "polare Glykosid" jedoch aus den Differenzen der enzymatischen Blausäurebestimmung und der gaschromatographischen Cardiosperminbestimmung dann ermitteln, wenn gesichert ist, daß neben Cardiospermin nur ein einziges weiteres Cyanglykosid vorliegt und beide Glykoside durch enzymatische Hydrolyse quantitativ gespalten werden. Diese Voraussetzungen sind wie in 6.2.1. angegeben, erfüllt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der gaschromatographischen Cardiosperminbestimmung und der indirekten Bestimmung des polaren Cyanglykosides graphisch wiedergegeben. Die Zahlenwerte finden sich tabellarisch im Anhang (Tabellen 25 bis 32).

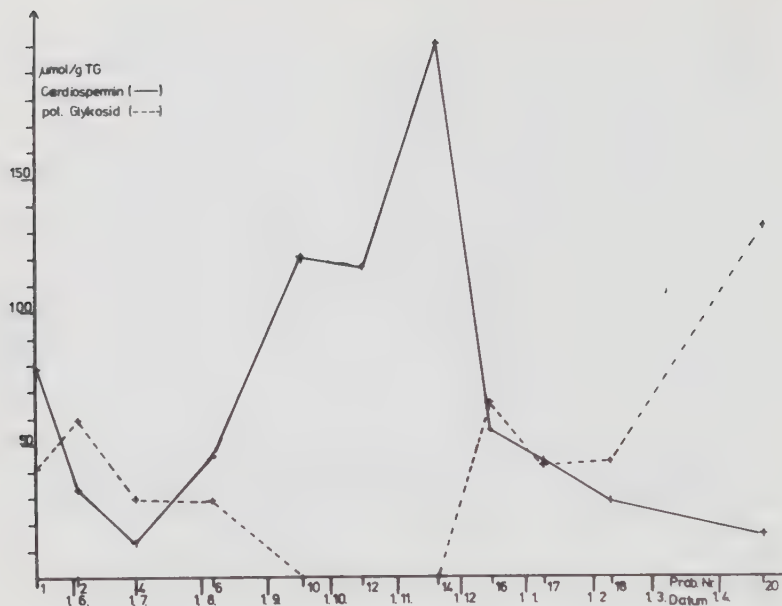


Abbildung 46: Cyanglykosidgehalt junger Blätter (Br0),
bezogen auf Organ

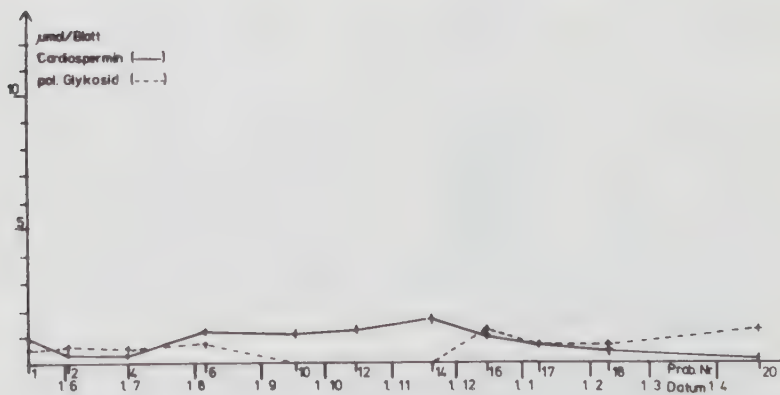


Abbildung 47: Cyanglykosidgehalt junger Blätter (Br0),
bezogen auf Trockengewicht

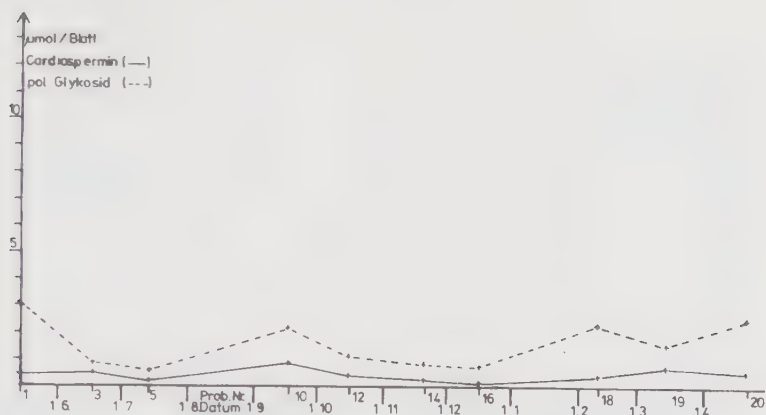


Abbildung 48: Cyanglykosidgehalt alter Blätter (BrU),
bezogen auf Organ

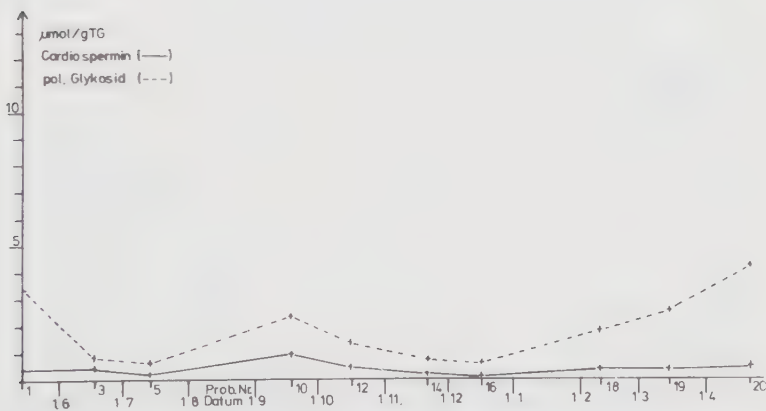


Abbildung 49: Cyanglykosidgehalt alter Blätter (BrU),
bezogen auf Trockengewicht

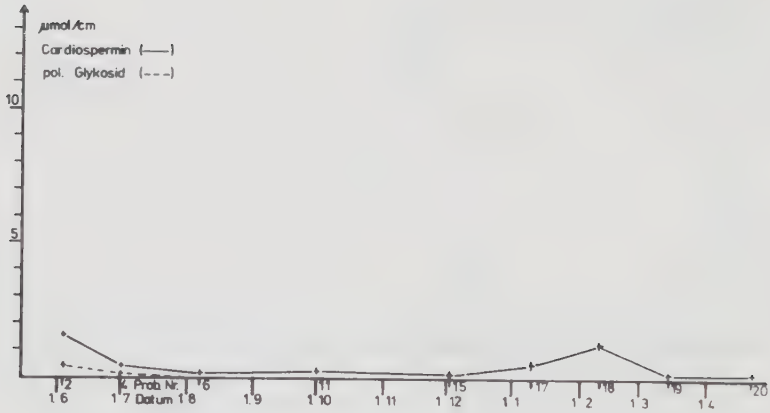


Abbildung 50: Cyanglykosidgehalt des oberen Sproßachsenabschnittes (Sp0), bezogen auf Längeneinheit (cm)

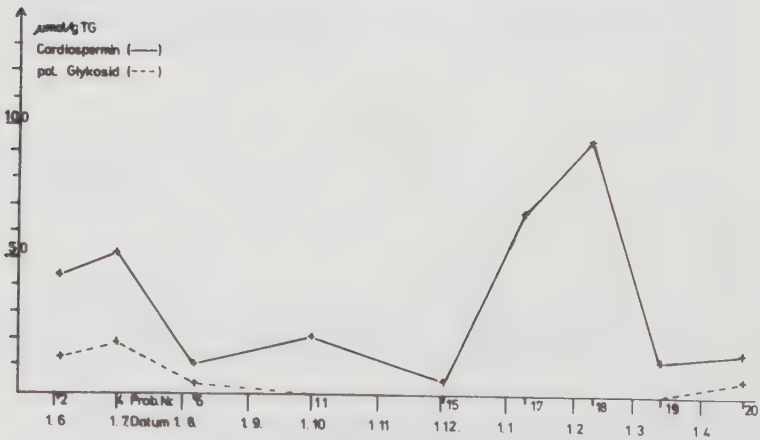


Abbildung 51: Cyanglykosidgehalt des oberen Sproßachsenabschnittes (Sp0), bezogen auf Trockengewicht

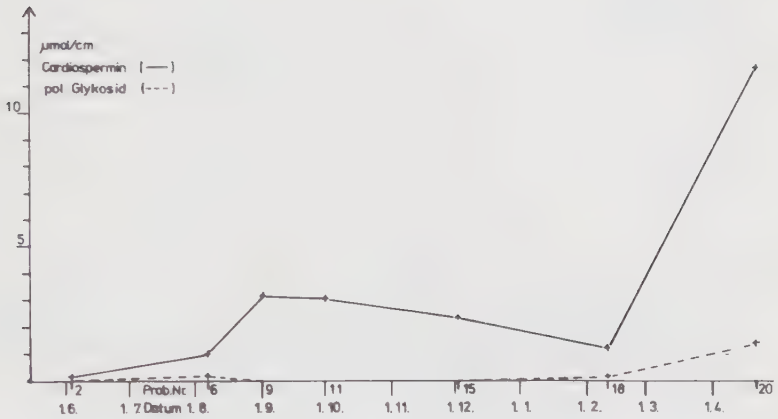


Abbildung 52: Cyanglykosidgehalt des unteren Sproßachsenabschnittes (SpU), bezogen auf Längeneinheit (cm)

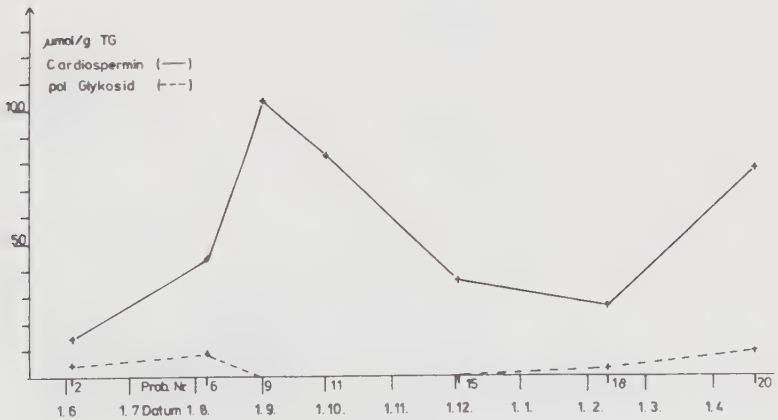


Abbildung 53: Cyanglykosidgehalt des unteren Sproßachsenabschnittes (SpU), bezogen auf Trockengewicht

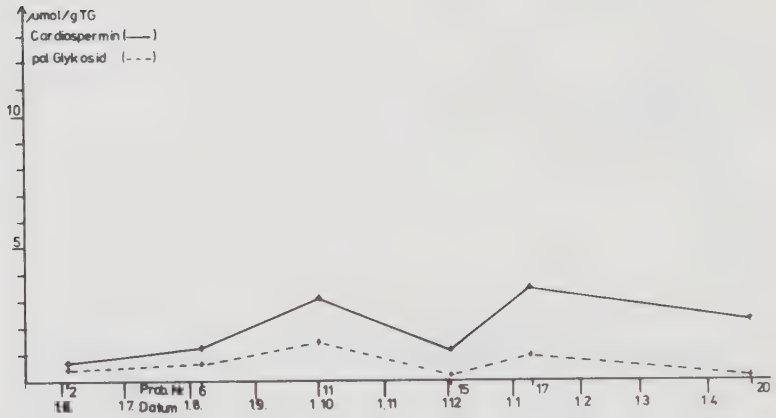


Abbildung 54: Cyanglykosidgehalt der Wurzel (W), bezogen auf Trockengewicht

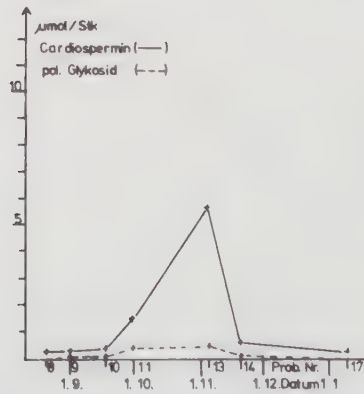


Abbildung 55: Cyanglykosidgehalt von Knospen (Kn), Blüten (Bn) und Früchten (Fr), bezogen auf Organ

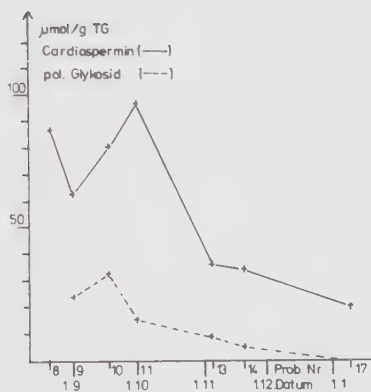


Abbildung 56: Cyanglykosidgehalt von Knospen (Kn), Blüten (Bn) und Früchten (Fr), bezogen auf Trockengewicht

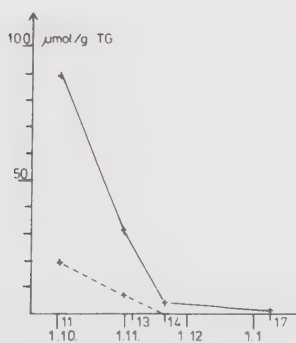
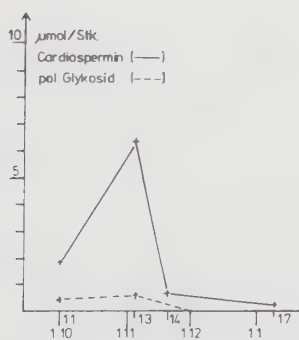


Abbildung 57: Cyanglykosidgehalt von Fruchtwänden

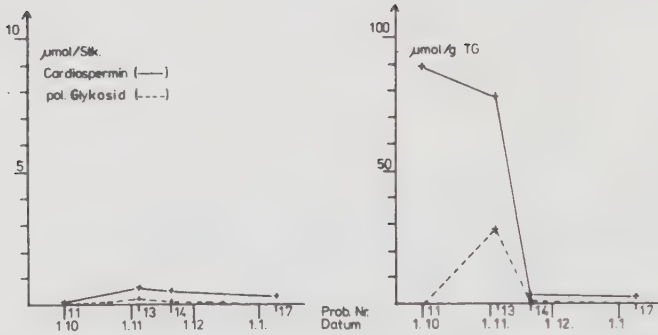


Abbildung 58 : Cyanglykosidgehalt von Samen

c. 5. Zusammenfassung und Fälligkeit der Ergebnisse

In der Wurzel finden sich während der gesamten Vegetationsperiode beide Cyanglykoside. Während das polare Cyanglykosid einen relativ konstanten Verlauf aufweist, zeigt die Kurve für Cardiospermin, daß die Hauptmenge des Blausäuregehaltes ausmacht, zwei Maxima. Beim Vergleich des Blausäuregehaltes der Wurzel mit denen anderer Organe muß allerdings berücksichtigt werden, daß für die Wurzel nur das Trockengewicht als Bezugsgröße herangezogen werden konnte (s.6.1.).

Bei den Blättern zeigt sich, daß die oberen Organe nur zu bestimmten Zeiten das "polare Cyanglykosid" enthalten. Cardiospermin dagegen läßt sich während des ganzen Jahres nachweisen. Bemerkenswert ist, daß die Cardiosperminkonzentration in der Zeit am höchsten ist, in der kein "polares Cyanglykosid" vorliegt. Bei den unteren Blättern dagegen treten während der gesamten Vegetationsperiode beide Cyanglykoside auf. Die Konzentration an Cardiospermin bleibt während des gesamten Untersuchungszeitraumes verhältnismäßig konstant, die beobachteten Schwankungen des Blausäuregehaltes sind demnach auf Änderungen der Menge an "polaren Cyanglykosid" zurückzuführen.

In der Sproßachse ist vor allem Cardiospermin enthalten. Im oberen wie im unteren Achsenabschnitt zeigt sich aber zu Anfang und Ende des gewählten Untersuchungszeitraumes, daß auch in diesem Organ das "polare Cyanglykosid" vorkommt.

In Knospen, Blüten und Früchten wird vor allem Cardiospermin gefunden. Das "polare Cyanglykosid" erscheint erstmalig in den Blüten und erreicht in den jungen Früchten ein Maximum. Danach fällt die Kurve leicht ab. In den letzten beiden Fruchtproben kann kein polares Cyanglykosid mehr nachgewiesen werden. Samen und Fruchtwände folgen der Kinetik

der Gesamtfrucht, allerdings ist der Abfall der Cyanglykosidkurven in den Samen weniger steil. Ab der Probennummer 12 treten in den Samen, und damit auch in der Gesamtfrucht, Cyanolipide auf. Die Konzentration dieser Verbindungen nimmt gegen Ende der Fruchtreife stark zu (s. auch 6.2.2.).

7. Diskussion

In Kapitel 1.4. wurde Zielsetzung der vorliegenden Arbeit formuliert. Bis auf den Punkt 4 konnten auf alle aufgeworfenen Fragen Antworten gefunden werden.

Am Beispiel von *C. grandiflorum* wurde gezeigt, daß alle Organe der Pflanze - nicht nur die vegetativen - cyanogene Glykoside führen. In den Samen treten von einem bestimmten Reifestadium an auch Cyanolipide auf. Zur Untersuchung der Struktur der Cyanglykoside wurde auch *H. oleae-folium* herangezogen. Es konnte festgestellt werden, daß die Sapindaceen Cyanglykoside der Butyronitrilreihe bilden. Aus *H. oleae-folium* wurde neben Cardiospermin (2- β -D-glucopyranoxy-3-hydroxymethylbutyronitril-3-en), daß aus *C. hirsutum* Willd., isoliert worden war (SEIGLER et al. 1974b), als neue Verbindung Heterodendrin (2- β -D-glucopyranoxy-3-methylbutyronitril) isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt werden (s.4.2.). In *C. grandiflorum* wurde ein weiteres, bisher unbekanntes Blausäureglykosid als Derivat des Cardiospermins gefunden, für das Beiträge zur Strukturaufklärung erbracht wurden (s.5.2.2.).

Cyanglykoside mit Butyronitrilstruktur sind auch aus Mimosaceen (STEYN und RIMINGTON 1935; SEIGLER et al. 1975c) und Rosaceen (NAHRSTEDT 1976) bekannt. Das isolierte Heterodendrin ist mit dem in *Acacia sieberiana* gefundenen Dihydroacacipetalin strukturgleich. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration, die über chemischen Abbau und gaschromatographischen Vergleich von Epimeren vorgenommen wurde, ergab für Heterodendrin-(S)-Konfiguration am C-2 des Aglykon. Dihydroacacipetalin stand nicht zur Verfügung; statt dessen war uns aber das ebenfalls in *A. sieberiana* vorkommende Proacacipetalin (2- β -D-glucopyranoxy-3-methylbutyronitril-3-en) zugänglich. Auch für diese Verbindung wurde (S)-Konfiguration im Aglykon ermittelt (s.4.2.3.).

Die Hydroxylierung der als Zwischenstufe bei der Biosynthese der Cyanglykoside auftretenden Nitrile erfolgt streng stereospezifisch (BISSET et al. 1969; ZILG et al. 1972), es ist kein Fall bekannt, daß in einer Pflanze genuin epimere Blausäureglykosidpaare vorkommen. Daher kann gefolgert werden, daß die übrigen bekannten Butyronitrilglykoside in ihren Aglyka ebenfalls der (S)-Reihe angehören. Heterodendrin steht der biogenetischen Ausgangssubstanz Leucin strukturell am nächsten. Formal lassen sich somit die bislang bekannten von Leucin biogenetisch ableitbaren Cyanglykoside in folgende Sequenz einordnen:

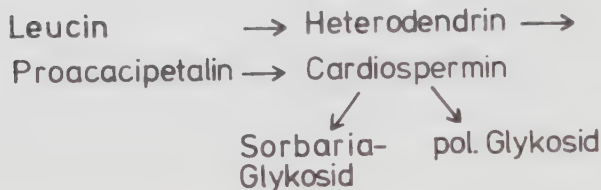


Abbildung 59 : Formale Biosynthesesequenz der Butyronitrilglykoside

Auch für die in *C. grandiflorum* und *H. oleaeifolium* vorkommenden Cyanolipide, deren Biogenese ebenfalls vom Leucin ausgeht (SEIGLER und BUTTERFIELD 1976b; SEIGLER und KENNARD 1977c), läßt sich (S)-Konfiguration am C-2 der Nitrilkomponente vermuten.

Trotz Einsatzes der Hochdruckflüssigchromatographie gelang es nicht, die Cyanolipide anhand ihrer Fettsäurereste in

einheitliche Fraktionen aufzutrennen. Da die vorliegenden Verbindungen zwei veresterte alkoholische Hydroxylgruppen aufweisen, kann der Einfluß der Positionierung der beiden Fettsäureester zur Erklärung der Uneinheitlichkeit der erhaltenen Fraktionen herangezogen werden. Die Bestimmung des Cyanglykosidtypes im Samenöl von *C. grandiflorum* bestätigte die Literaturangaben (SEIGLER und KAWAHARA 1976c), daß es sich um Fettsäurediester des 2-Hydroxy-3-hydroxymethylbutyronitril-3-en handelt. Für *H. oleaefolium*, dessen Samenöl bislang unbekannt war, konnte festgestellt werden, daß als Alkoholkomponente der cyanogenen Lipide ebenfalls das 2-Hydroxy-3-hydroxymethylbutyronitril-3-en auftritt. Als Estersäuren finden sich bei beiden Spezies bevorzugt Fettsäuren mit Kettenlängen von $C_{18/1}$, $C_{20/0}$ und $C_{20/1}$. In geringerem Maße kommen aber auch die Fettsäuren $C_{16/0}$, $C_{16/1}$, $C_{18/0}$ und $C_{18/2}$ vor (s. 4.3.4. und 5.3.4.).

Alle Organe von *C. grandiflorum* enthalten in mehr oder minder hoher Konzentration glykosidisch gebundene Blausäure (s. 6.2.3.). Zusätzlich treten in den Samen im späten Reifestadium auch Cyanolipide auf, wogegen die Cyanglykosidkonzentration zu diesem Zeitpunkt stark abfällt. Die gesamte glykosidisch gebundene Blausäure entstammt Cardiospermin und einem weiteren Cyanglykosid. Andere cyanogene Verbindungen konnten ausgeschlossen werden (s. 6.3.4.).

Wegen ihrer Fähigkeit Blausäure freizusetzen werden Cyanglykoside von manchen Autoren als Abwehrstoffe und daher als Selektionsvorteil für die betreffenden Pflanzen angesehen (JONES 1972, 1973; NAHRSTEDT 1973; HEGNAUER 1977). Es ist ein bekanntes Phänomen, daß die stärker von Schädlingsbefall bedrohten jungen Organe einer Pflanze höhere Blausäureglykosidkonzentrationen aufweisen als die älteren (JONES 1972). Auch bei *C. grandiflorum* enthalten die jungen Blätter - bezogen auf Trockengewicht - deutlich mehr abspaltbare Blausäure als die entsprechenden älteren Organe (s. auch Abb. 33 und 34). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß zwar die unteren Blätter der kultivierten Pflanzen, niemals jedoch die oberen, Fraßblöcher aufwiesen. Bei den generativen Organen nimmt

der Blausäureglykosidgehalt - bezogen auf das Trockengewicht - gegen Ende der Fruchtreife ab (s. auch Abb. 38). Möglicherweise tritt hier an Stelle des chemischen ein mechanischer Schutz durch Sklerifizierung der Fruchtwand. Andererseits ist kein Abwehrmechanismus absolut wirksam und so kann auch die Cyanogenese nur als Teil des Verteilungssystems der Pflanze gesehen werden.

Eine Kumulation von Blausäureglykosiden in bestimmten Organen einer Pflanze kann entweder dadurch erfolgen, daß die Verbindungen an Ort und Stelle von den entsprechenden Enzymsystemen synthetisiert werden, oder dadurch, daß eine Translokation der Substanzen vom Ort der Bildung zum Ort der Kumulation stattfindet.

Über den Transport von sekundären Pflanzenstoffen ist wenig bekannt; für die Alkaloide konnte eine Translocation nachgewiesen werden (MOTHES und ROMEIKE 1958), Flavonoide dagegen werden nicht transportiert (SCHULZ 1969). Die Angaben der Literatur für die cyanogenen Glykoside sind widersprüchlich (CZAPEK 1925; ROBINSON 1930; DILLEMANN 1958; NAHRSTEDT 1971, 1975b).

Legt man die Annahme zu Grunde, daß die unterschiedlichen Mengen an Cyanglykosiden in den einzelnen Organen von *C. grandiflorum* im Verlaufe der Vegetationsperiode auf einen Transport zurückzuführen sind, so muß eine Translocation vom Ort der Bildung zum Ort des Abbaus angenommen werden. Der Assimilatferntransport in der Pflanze findet im Phloem statt (FRITZ und ESCHRICH 1970), hier bleibt während des Transportes - wie im übrigen symplasmatischen System - die metabolische Kontrolle über die transportierten Verbindungen erhalten (LÜDTGE 1973). Es kann angenommen werden, daß auch eine eventuelle Translocation von Cyanglykosiden auf diesem Wege stattfindet.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß für die Sproßachse ein Transport von oben nach unten postuliert werden müßte (s. auch 6.3.4.). Die Cardiosperminmenge des oberen Sproß-

achsenabschnittes nimmt zwischen Anfang Juli und Anfang August ab, während die Konzentration der Verbindung in den unteren Abschnitten zu dieser Zeit einen Zuwachs erfährt und gegen Mitte September ein Maximum erreicht. Die Geschwindigkeit des Phloemtransportes wird von CANNY (1971) mit 1 cm/h bis 200 cm/h angegeben. Selbst bei Zugrundelegung einer Transportgeschwindigkeit von nur 1 cm/h hätte die Zunahme der Cardiosperminkonzentration - die Pflanzen waren im angesprochenen Zeitraum etwa 300 cm lang - schon eher deutlich werden müssen.

Auch bei den Blättern lassen sich die Schwankungen im Cyanglykosidgehalt nach den derzeitigen Modellvorstellungen über die Geschwindigkeit der Translocation nicht mit einem Transport erklären. Zwar zeigt sich bei den oberen Blättern ab Ende November starker Rückgang der Cardiosperminkonzentration, doch erscheint zu dieser Zeit kein entsprechend signifikanter Anstieg in unteren Blättern oder anderen Organen der Pflanze.

Aus dem oben gesagten geht hervor, daß aus den vorliegenden Daten keine Translocation der cyanogenen Verbindungen in den vegetativen Organen von *C. grandiflorum* abgeleitet werden kann. Vielmehr scheinen andere Ursachen für die Schwankungen im Blausäureglykosidgehalt der Pflanze verantwortlich zu sein.

Eine Anhäufung der cyanogenen Substanzen im Sinne eines "dead-end-flow" in einem metabolisch inaktiven pool findet offenbar nicht statt, wie die Abnahme der Blausäureglykosidmenge in den einzelnen Organen zu bestimmten Zeiten zeigt. Bei Ausschluß einer Translocation können deshalb die Glykoside nur einem Metabolismus unterliegen. Lediglich bei den Samen konnte kein Abfall des Cyanolipidgehaltes festgestellt werden. Doch auch für diese Substanzen muß ein Katabolismus postuliert werden, da sie in den vegetativen Teilen der Pflanzen nach der Keimung nicht mehr auftreten (SEIGLER und PRICE 1976a).

Vergleicht man bei den oberen Blättern die Kurvenverläufe von Cardiospermin und dem "polaren Cyanglykosid", so fällt auf, daß das "polare Glykosid" zu einem Zeitpunkt nicht mehr erscheint bzw. wieder gefunden wird, zu dem die Menge an Cardiospermin deutlich zu- bzw. abnimmt. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß Cardiospermin und das "polare Glykosid", daß nach unseren vorläufigen Ergebnissen zur Strukturaufklärung (s.5.2.2.) ein Bidesmosid des Cardiospermins darstellt, ineinander umgewandelt werden. Allerdings müssen neben der Möglichkeit der Metabolisierung auch katabole Prozesse in Betracht gezogen werden, da bei Beginn der Abnahme der Konzentration an "polarem Glykosid" auch die Cardiosperminmenge leicht abnimmt. Zudem reduziert sich bei Anstieg der Konzentration an "polarem Glykosid" im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode die Cardiosperminmenge überproportional (s. Abb. 47 und 48).

In den Samen treten während des Abfallens der Cardiosperminkonzentration Cyanolipide auf, deren Nitrilkomponente dem Aglykon der Cyanglykoside entspricht. Hieraus kann die Vorstellung abgeleitet werden, daß die im jungen Reifestadium der Samen einzig vorliegenden Cyanglykoside zu Cyanolipiden metabolisiert werden. Der Anstieg der Lipide ist aber so groß, daß Cardiospermin nur dann eine biogenetische Vorstufe für die Alkoholkomponente der Cyanolipide darstellen kann, wenn im Zuge eines "steady-state" der Cardiospermin-"pool" laufend ergänzt wird. Bemerkenswert ist, daß sich in den reifen schwarzen Samen (Probe Sa 17) als einzigen Organen keine die Cyanglykoside spaltende β -Glukosidase nachweisen ließ (s. auch Tab. 3).

Abb. 60 faßt diese Ergebnisse zusammen: Ausgehend von der Aminosäure Leucin wird als quantitativ überwiegende cyanogene Verbindung Cardiospermin gebildet (1). Auf der Glykosidstufe ist es wahrscheinlich, daß Cardiospermin in das "polare Glykosid" überführt wird (3), welches als Derivat des Cardiospermins eindeutig belegt wurde (s.5.2.2.). Zwischen der Konzentration an "polarem Glykosid" und dem Cardiospermin-"pool" besteht keine stöchiometrische Kor-

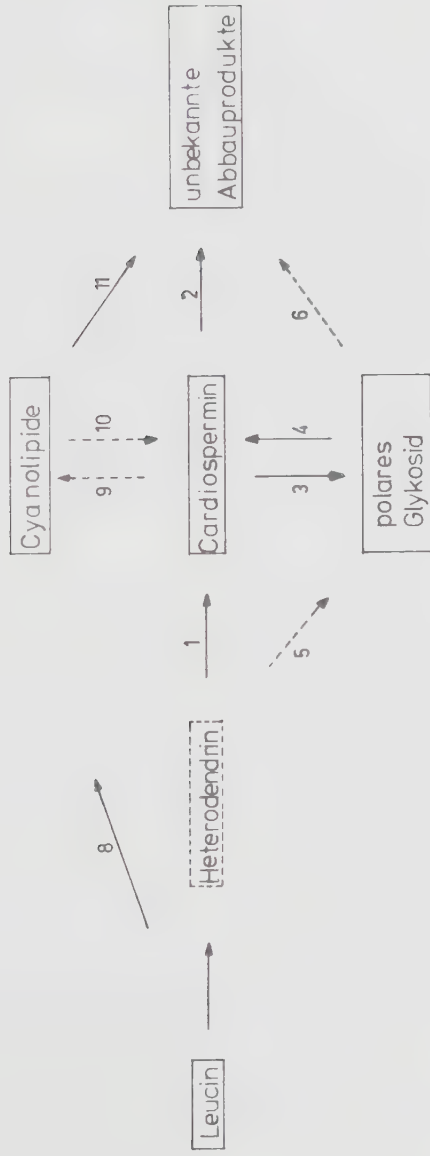


Abbildung 60: Hypothetische biogenetische Zusammenhänge der cyanogenen Verbindungen in *C. grandiflorum*

relation. Es muß daher ein Katabolismus von Cardiospermin angenommen werden (2), der zu unbekannten Abbauprodukten führt. Ein Katabolismus des "polaren Glykosids" kann auf zwei Wegen erfolgen, einmal ist eine Desglukosidierung zu Cardiospermin möglich (4), zum anderen kann ein Abbau vorliegen, der zu unbekannten Metaboliten führt (6). MCFARLANE et al. (1975) postulieren für die Bildung von Dhurrin in Sorghum einen Multienzymkomplex. Bei Vorliegen eines solchen Systems sollte zumindest die Bildung des "polaren Glykosides" über Cardiospermin erfolgen (3), in dem Fall könnte ein anderer direkt von Leucin ausgehender Biosyntheseweg ausgeschlossen werden (5). Bei Vorliegen eines Multienzymkomplexes muß das intermediäre Auftreten von Heterodendrin (vgl. Abb. 56) als wahrscheinlich angesehen werden. Allerdings dürfte diese Verbindung nur in so geringer Konzentration auftreten, daß sie mit den angewendeten Methoden nicht erfaßt werden konnte.

Über den Metabolismus der Cyanolipide läßt sich aufgrund der bisher vorliegenden Daten wenig aussagen. Es bleibt offen, ob die Bildung dieser Verbindungen über Cardiospermin (9) verläuft oder über einen anderen Weg direkt aus Leucin (8). Auch der Katabolismus ist unklar, hier sind wiederum zwei Wege denkbar, entweder über die zentrale Cyanoverbindung Cardiospermin (10) oder zu bisher unbekannten Abbauprodukten (7).

Weitergehende Erkenntnisse über biogenetische Zusammenhänge der Cyanglykoside und -lipide könnten anhand von Fütterungsversuchen mit markierten Vorstufen und auch bei Verwendung von Verlustmutanten, die dann Zwischenprodukte der Biosynthesewege anhäufen, gewonnen werden.

8. Experimenteller Teil

8.1. Pflanzenmaterial

8.1.1. Heterodendron oleaeifolium

Es wurden luftgetrocknete Blätter und Zweigholz verwendet, die von der City Parks Administration Canberra (Australien) im Mai 1974 in New-South-Wales gesammelt worden waren. Weitere Blattmuster kamen vom Royal Botanical Garden and National Herbarium Sydney (Australien). Die zur Untersuchung benötigten Samen wurden im Samenhandel bei Nindethana Seed Service, Wellington N.S.W. (Australien), bezogen.

8.1.2. Cardiospermum grandiflorum

Alle untersuchten Proben stammen aus Stecklingen, die am 11. 03. 1975 von einem im Botanischen Garten der Universität Freiburg (Breisgau) vorhandenen Exemplar gewonnen wurden. Die Stecklingen wurden unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus kultiviert.

8.1.2.1. Sammeln der Proben

Die Proben wurden jeweils am Nachmittag zwischen 15 und 17 Uhr gesammelt. Das Pflanzenmaterial wurde an Ort und Stelle in Dewar-Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sproßachsen und Wurzeln wurden grob zerkleinert. Früchte wurden - soweit möglich - in Samen und Fruchtwand zerlegt. Gesammelt wurden Blätter, Sproßachsen, Wurzeln, Knospen, Blüten und Früchte.

7.1.2.2. Vorbereiten der Proben

Die Proben wurden in tiefgefrorenem Zustand unter flüssigem Stickstoff im Porzellanmörser, verholzte Stengelabschnitte und Samen in einer Drogenmühle, zerkleinert und

anschließend gefriergetrocknet. Das Trockenmaterial wurde in luftdicht schließenden Kunststoffbehältern bis zur Weiterverarbeitung bei -25°C in einer Tiefkühltruhe gelagert.

8.2. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

8.2.1. Isolierung von Cyanglykosiden

100 g des pulverisierten Pflanzenmaterials (8.1.1. oder 8.1.2.) wurden 2 h lang mit Petroläther am Rückfluß extrahiert. Der Petrolätherauszug wurde verworfen und das Extraktionsgut mit Preßluft getrocknet. Danach wurde 2 x 3 h mit Methanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte (etwa 1 l) wurden unter Zusatz von Wasser am Vakuumrotationsverdampfer (VRV) bei 30°C zur Methanolfreiheit eingeengt. Danach wurden alle nicht wasserlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde aus wenig Wasser über eine Polyamidotrockensäule (Polyamid zur Säulenchromatographie, Woelm) (30 g) gegeben. Das Eluat wird nach erneuter Gefrier Trocknung über Cellulose (Cellulose "Avicel", Merck) mit $\text{EtOAc} : \text{Me}_2\text{CO} : \text{H}_2\text{O}$ (4:5:1) chromatographiert. Es wurden Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen und auf Blausäure getestet (s.8.7.4.). Die positiven Fraktionen wurden gesammelt und über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60 zur Säulenchromatographie, Merck) (200 g) mit n-PropOH als Fließmittel chromatographiert. Die cyanidaktiven Fraktionen wurden an Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) präparativ weiter aufgetrennt und die Glykoside mit Methanol vom Papier eluiert. Das Eluat wurde am VRV zum Trocknen eingeengt, in wenig Wasser aufgenommen und über wenig Kohle filtriert, anschließend gefriergetrocknet und für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Abweichend hiervon wurde das "polare Cyanglykosid" aus *C. grandiflorum* durch Chromatographie des Methanolextraktes über Cellulose (100 g) mit n-BuOH und i-PropOH : n-BuOH

- 22 -

: H_2O (70:20:10) isoliert. Als weiterer Reinigungsschritt wurde präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgelfertigplatten mit $\text{EtOAc} : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HOAc}$ (70:20:8:2) angeschlossen. Die cyanidaktive Zone wurde ausgekratzt und mit $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1:1) eluiert. Der Ansatz wurde am VRV zum Trocknen eingeengt, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

8.2.2. Isolierung von Cyanolipiden

10 bis 30 g gepulverte Samen wurden 2 x 4 h lang mit Petroläther am Soxhlet extrahiert. Die vereinigten Petrolätherauszüge wurden am VRV bis zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels eingeengt. Das so gewonnene Öl wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

8.2.3. Aufarbeitung zur quantitativen Blausäurebestimmung

1,00 g Trockenmaterial (genau gewogen) wurde extrahiert (s.8.2.1.). Von den vereinigten Methanolauszügen wurden, je nach zu erwartender Blausäuremenge, 1 % bis 10 % zur Blausäurebestimmung eingesetzt (s.8.3.3.).

8.2.4. Aufarbeitung zur quantitativen gaschromatographischen Cyanglykosidbestimmung

1,00 g Trockenmaterial (genau gewogen) wurde extrahiert (s.8.2.1.). Die vereinigten Methanolauszüge wurden, je nach zu erwartender Menge an Cyanglykosid, entweder ganz oder zur Hälfte, zur Bestimmung eingesetzt. Dazu wurde der Extrakt auf 0,5 g Cellulose aufgezogen und an den Start eines mit 4,5 g Cellulose trocken gefüllten Chromatographierohres ($\varnothing = 1,5 \text{ cm}$) gegeben.

Mobile Phase: Wassergesättigtes n-Butanol (20°C)

Eluat: 20 ml (2 Säulenvolumen)

Das Eluat wird unter Zusatz von Wasser am VRV bis zur Butanolfreiheit eingeengt. Die zurückbleibende wäßrige Sus-

pension wird durch weiteres Einengen am VRV auf ein Volumen von etwa 2 ml gebracht und mit 0,2 n Essigsäure auf einen pH von etwa 3 eingestellt. Das Eluat wird nun quantitativ unter mehrfachem Nachspülen mit Wasser auf eine Polyamidsäule aufgegeben (3 g Polyamid, trocken in ein Chromatographierohr $\varnothing = 1,5$ cm eingefüllt).

Mobile Phase: Wasser

Eluat: 15 ml (3 Säulenvolumen)

Das Eluat wird gefriergetrocknet und nach Aufnehmen in Pyridin zur gaschromatographischen Bestimmung (s.8.11.2.) eingesetzt. Bei einem Teil der Proben wurde der Ansatz halbiert und je eine Hälfte zur Dünnschichtchromatographie nach (s.8.7.2.) und zur Gaschromatographie verwendet.

8.3. Quantitative Blausäurebestimmung

8.3.1. Säurehydrolyse

1,0 bis 10,0 ml eines nach 8.2.3. hergestellten und auf ein Volumen von 100,0 ml gebrachten Extraktes werden am VRV zur Trocknung eingengt und in der Cyanidbestimmungsgeschäpung nach KRÖLLER (1965) in der Modifikation von NAHRSTEDT (1971) zur Hydrolyse eingesetzt.

Der Ansatz wird in etwa 150 ml Wasser aufgenommen, mit 500 mg Semicarbaziddihydrochlorid und 20 ml konz. H_3PO_4 versetzt. Danach wird die Apparatur verschlossen und unter Durchleiten von Stickstoff (reinst) 4 h lang zum Sieden erhitzt. Die im Stickstoffstrom übergehende Blausäure wird in einer Vorlage in 10 ml 0,5 n NaOH aufgefangen.

8.3.2. Enzymatische Hydrolyse

1 bis 10 ml eines nach 8.2.3. hergestellten und auf ein Volumen von 100,0 ml gebrachten Extraktes werden am VRV zur Trockne eingengt und in der Cyanidbestimmungsgeschäpung nach KRÖLLER (1965) und NAHRSTEDT (1971) zur Hydrolyse eingesetzt.

Dazu wird der Ansatz in etwa 150 ml Wasser aufgenommen und nacheinander mit

50 ml Citratpuffer pH 6,0,
500 mg Semicarbaziddihydrochlorid (in wäßriger Lösung, mit 1 N NaOH auf pH 6,0 eingestellt),
5 ml 0,1 N Dinatriumäthylendiamintetraacetatlösung und
0,1 mg β -Glukosidase aus Mandeln (β -Glukosidase reinst, Serva, Heidelberg) versetzt.

Das Reaktionsgefäß wird sofort nach der Enzymzugabe verschlossen. Bei einer Temperatur von 55°C wird unter Durchleiten von Stickstoff 15 h lang hydrolysiert. Die im Stickstoffstrom übergehende Blausäure wird in einer Vorlage in 10 ml 0,5 N NaOH aufgefangen. Danach wird eine Stunde lang zum Sieden erhitzt und nach Abkühlen und Zugabe von 0,1 mg Enzym die Hydrolyse weitere 6 h fortgesetzt. Nach erneutem einstündigem Aufkochen des Ansatzes wird die in der Vorlage befindliche Lösung quantitativ in ein 50 ml Meßkölbchen überführt, welches bis zur Marke aufgefüllt wird (NAHRSTEDT 1971).

8.3.3. Modifizierte enzymatische Hydrolyse

1 bis 10 ml eines nach 8.2.3. hergestellten und auf ein Volumen von 100,0 ml gebrachten Extraktes werden in einem 10-ml-Spitzkölbchen zur Trockne eingengt und in einer modifizierten Cyanidbestimmungsapparatur (s. Abb. 60 im Anhang) zur Hydrolyse eingesetzt.

Dazu wird der Ansatz mit 1 ml einer Mischung aus 500 mg Semicarbaziddihydrochlorid (in wäßriger Lösung, mit NaOH auf pH 5,5 eingestellt)
5 ml 0,1 M Dinatriumäthylendiamintetraacetatlösung und bis 50 ml McIlvain-Puffer pH 5,5 versetzt. Das Reaktionsgefäß wird sofort nach Zugabe von 0,1 ml einer Lösung von 5 mg β -Glukosidase (reinst, Serva, Heidelberg) in 1 ml McIlvain-Puffer pH 5,5 verschlossen. Bei einer Temperatur von 42°C wird in einem thermokonstanten Wasserbad unter Stickstoffdurchfluß 3 h lang hydrolysiert.

Nach einer und zwei Stunden werden durch das Stickstoffeingleitungsrrohr zweimal weitere 0,1 ml der Enzymlösung zugegeben. Die im Stickstoffstrom übergehende Blausäure wird in einem als Vorlage dienenden Meßkölbchen (50 ml) in 10 ml 0,5 N NaOH aufgefangen. Nach Beendigung der Hydrolyse wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

8.3.4. Bestimmung der Blausäure

Die Bestimmung der Blausäure erfolgte nach ALDRIGE/KRÖLLER (s.3.1.1.4.). Von der nach der Hydrolyse (8.3.2; 8.3.3.; 8.3.4.) erhaltenen Cyanidlösung werden 25,00 ml in ein 50 ml Meßkölbchen überführt, mit 2 Tropfen alkoholischer Methylrotlösung versetzt und mit 1 N HCl angesäuert. In Abständen von jeweils 5 min werden zugesetzt:

1 ml gesättigtes Bromwasser
1 ml 5%ige Ascorbinsäurelösung
10 ml einer Mischung von 20 ml Pyridinreagenz* und 5 ml Benzidinlösung**+.

Nach Auffüllen mit Wasser auf 50,00 ml wird der Ansatz für 15 min dunkel gestellt. Danach wird bei 524 nm am PMQ II (Zeis, Oberkochem) gegen Wasser die Extinktion gemessen. Die den Extinktionswerten zugehörigen Blausäurekonzentrationen werden einer Eichkurve entnommen. Die Erfassungsgrenze der Methode liegt bei etwa 40 ng HCN/ml (NAHRSTEDT 1971).

-
- * 350 ml Pyridin werden mit 50 ml HCl (37 %) gemischt
 - ** 12,8 g Benzidin werden heiß in einer Mischung aus 150 ml H₂O und 12,5 ml HCl (6N) gelöst und mit H₂O auf 250 ml aufgefüllt.
 - + Zur Verwendung von Benzidin vergl. Fußnote 3.1.1.4.

8.4. Enzympräparationen

8.4.1. Herstellung der Enzympräparation aus *C. grandiflorum*

Acetontrockenpulver

Etwa 10 g frisch Blätter von *C. grandiflorum* wurden in einem explosionsgeschütztes Warring-Blendor im Kühlraum mit eisgekühltem Aceton mehrmals extrahiert, bis ein fast weisses Blattpulver zurückblieb. Das Aceton wurde im Vakuum entfernt und das zurückbleibende Pulver sinngemäß wie unten aufgearbeitet.

Rohsaft

Etwa 10 g frische Blätter von *C. grandiflorum* wurden im Kühlraum bei $+4^{\circ}\text{C}$ 30 min lang mit 50 ml McIlvain-Puffer pH 5 und 1,0 g Seesand im Mörser zerrieben. Der Organbrei wurde dann bei 30 000 g 30 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohsaft eingesetzt.

Nachdem die so hergestellten Rohsäfte keine zufriedenstellende Haltbarkeit zeigten (s.3.1.1.2.) wurden bei der Herstellung 100 ml Merkaptöthanol zugesetzt.

Ammoniumsulfatfällung

Es wurde eine Ammoniumsulfatfällung bei 60 % Sättigung vorgenommen. Der entstandene Niederschlag wurde bei 30 000 g abzentrifugiert und in 2 ml McIlvain-Puffer (0,1 M pH 5) wieder aufgenommen.

8.4.2. Enzympräparation aus Leinsamen

Aus 100 g Leinsamen wurden 60 g Acetontrockenpulver gewonnen. Dieses wurde in Portionen zu 20 g mit je 400 ml Wasser

geschüttelt und zentrifugiert. Unter Rühren wurde der Überstand mit 200 ml Acetatpuffer (0,2 M, pH 4,6) versetzt und die ungelösten Bestandteile abzentrifugiert. Dem Überstand wurde bei +4°C 100 ml Äthanol zugefügt und das Sediment abzentrifugiert. Dann wurde bis zu einer Konzentration von 60 % (v/v) abermals Äthanol zugegeben. Das Sediment wurde in McIlvain-Puffer pH 5 aufgenommen, gegen Wasser dialysiert und anschließend bei 20 000 g und 0°C 30 min zentrifugiert. Nach Abtrennen des Sedimentes wurde der Überstand gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in Acetatpuffer (0,2 M, pH 4,6) aufgenommen und in einer Verdünnung von 10^{-3} getestet (s. 8.4.3.).

8.4.3. Testung der Enzympräparation

Cardiospermin

0,1 ml des nach 7.12.2. hergestellten Rohsaftes wurden mit 0,1 ml McIlvain-Puffer (pH 5) und 0,1 ml Cardiosperminlösung (1 mg/ml) 30 min lang unter Stickstoffbegasung in der bei 8.3.3. beschriebenen Blausäurebestimmungssapparat bei 30°C inkubiert.

Blausäureblindwerte

0,1 ml des nach 7.12.2. hergestellten Rohsaftes wurden mit 0,2 ml McIlvain-Puffer (pH 5) 30 min lang unter Stickstoffbegasung in der bei 8.3.3. beschriebenen Blausäurebestimmungssapparat bei 30°C inkubiert.

4-Nitrophenyl-0-β-D-glukosid

0,1 ml des nach 8.4.1. hergestellten Rohsaftes wurden mit 0,1 ml McIlvain-Puffer (0,1 M, pH 5) und 0,1 ml 4-Nitrophenylglykosidlösung (1 mg/ml) 30 min lang bei 30°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 2 ml Natrium-

carbonallösung (1 M) versetzt und gegen einen Blindwert bei 400 nm vermessen. Die Konzentration des Hydrolyseproduktes 4-Nitrophenol wird einer Eichkurve entnommen.

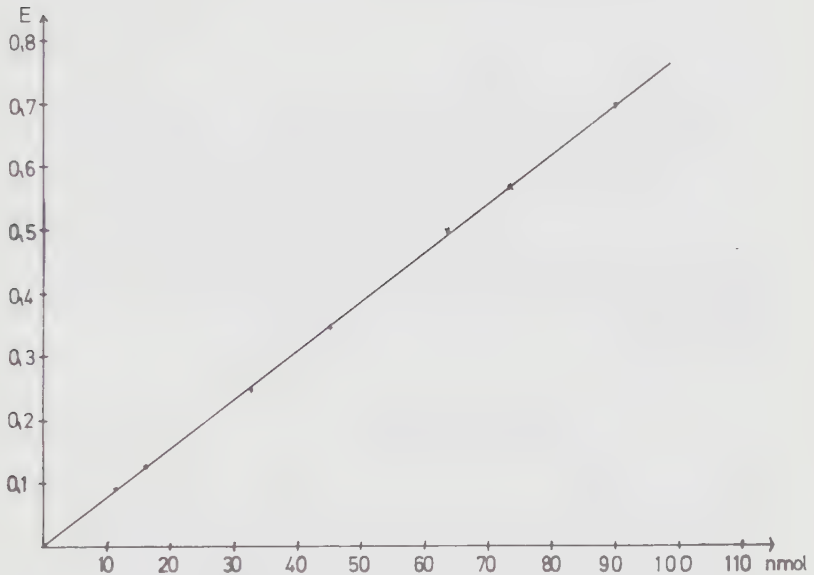


Abbildung G1: Eichkurve für 4-Nitrophenylglucosid

pH-Optimum der Enzympräparation

Die Aktivität des Rohsaftes gegen Cardiospermin und 4-Nitrophenyl-O- β -D-glucosid wurde bei verschiedenen pH-Werten gemessen (s. auch Tabelle 13 im Anhang).

8.5. Hydrolyse von Cyanolipiden

Blausäure

Die nach 8.2.2. erhaltenen Petroläther und Dichlormethanphasen wurden am VRV zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand

wurde mit 20 ml 1 N Natronlauge bei 50°C drei Stunden lang gerührt. Dann wurden 20 ml 9 N Schwefelsäure zugesetzt und der Ansatz unter Stickstoffbegasung eine Stunde lang in der bei 8.3.1. angegebenen Cyanidbestimmungsapparatur zum Sieden erhitzt. Die Blausäurebestimmung erfolgte nach 8.3.4.

Fettsäuren

Die nach 8.8.3. gesammelten cyanogenen Fraktionen wurden jeweils mit 1 ml 0,5 N äthanolischer Kalilauge (Reagenz DAB 7) eine Stunde lang am Rückfluß gekocht. Danach wurde der Ansatz mit 1 ml 1 N Salzsäure angesäuert und mit dreimal 2 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und nach Einengen am VRV zur Gaschromatographie eingesetzt (s. 8.13.2.).

8.6. Hydrolyse von Heterodendrin

2-Methylpropanal

10 mg Glykosid wurden mit 1 mg β -glukosidase reinst (Serva, Heidelberg) 3 h lang in 1 ml Wasser bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde halbiert, ein Teil mit Pentan ausgeschüttelt und direkt zur Gaschromatographie eingesetzt (s.8.12.). Die andere Hälfte wurde nach Derivatisierung zur Dünnschichtchromatographie verwendet (s.8.9.).

Glukose

1 mg Glukosid wurde mit 1 ml 1 N Salzsäure eine Stunde lang auf 100°C erhitzt. Die Lösung wurde danach gefriergetrocknet und zur Dünnschichtchromatographie (s.8.10.) sowie zur Gaschromatographie (s.8.14.) eingesetzt.

2-Hydroxy-3-methylbuttersäure

46 mg Glykosid wurden mit 1 ml Salzsäure (37 %) im Ölbad 30 min lang auf 120°C erhitzt. Der Ansatz wurde dreimal mit Diäthyläther ausgeschüttelt, die vereinigte Ätherfraktion über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am VRV zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde nach Derivatisierung zur Gaschromatographie nach 7.10.1. eingesetzt. Die Ausbeute betrug 19,26 mg $\hat{=}$ 92,6 %.

8.7. Flüssigkeitschromatographische Systeme für Cyan- glykoside

8.7.1. Papierchromatographie

Stationäre Phase: Papier (Nr. 2043b, Schleicher & Schüll, Dassel)

Mobile Phase : Methyläthylketon : Aceton : Wasser
(15:5:3)

Laufstrecke : etwa 42 cm, absteigend

R_{Glukose}-Werte : Heterodendrin: R_{GlC} = 11,30
Cardiospermin: R_{GlC} = 10,08

Die Papierchromatographie wurde zur präparativen Auftrennung eingesetzt.

8.7.2. Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase: Kieselgel

- a) Kieselgelfertigplatten (Merck, Darmstadt)
- b) Kieselgelalufolien (10 x 5 cm, Merck, Darmstadt)
- c) selbstgestrichene Kieselgelschichten, Schichtdicke 0,3 mm (Kieselgel GF₂₅₄ nach Stahl (Typ 60) z. DC, Merck, Darmstadt)

Mobile Phasen	: a) Methyläthylketon : Aceton : Wasser (15:5:1) b) n-Propanol : Chloroform : Wasser (85:10:1) c) Äthylacetat : Methanol : Wasser : Essigsäure (70:20:8:2) d) Methanol : Chloroform (1:2)
Laufstrecke	: 10 cm (bei Glasplatten) 5 cm (bei Alufolien)
Stationäre Phase	: Cellulose (Fertigplatten, Merck, Darmstadt)
Mobile Phase	: a) Äthylacetat : Aceton : Wasser (85:10:5) b) Metanol : Wasser (1:1) c) Methyläthylketon : Aceton : Wasser (15:5:3)
Laufstrecke	: 10 cm

8.7.3. Säulenchromatographie

Polyamid

Polyamid zur Säulenchromatographie (Woelm, Eschwege) wird trocken in ein unten mit Watte verschlossenes Chromatographierohr eingefüllt. Durch mehrmaliges Aufstoßen auf eine feste Unterlage wird das Sorptionsmittel verdichtet. Bevor die in wenig Wasser gelöste Probe aufgegeben wird, wird die Säule oben mit Watte verschlossen. Nach dem Einsickern der Probe wird mehrmals mit wenig Fließmittel nachgespült. Als mobile Phase wird Wasser verwendet. Die ersten drei Säulenvolumen werden aufgefangen.

Cellulose

Zur quantitativen Glykosidbestimmung werden Cellulose-trockensäulen verwendet. Hierbei werden 4,5 g mikrokristalline Cellulose (Avicel, Merck, Darmstadt) in ein Chromatographierohr eingefüllt und durch mehrmaliges Aufstoßen auf eine feste Unterlage verdichtet. Die in Methanol gelöste Probe wird mit 0,5 g Cellulose

vermischt auf dem Wasserbad bei 40°C im Luftstrom getrocknet. Die letzte Feuchtigkeit wird im Vakkumexiator entfernt und der Ansatz an den Start der Säule gegeben. Diese wird mit Watte abgedeckt und mit bei 20°C wassergesättigtem n-BuOH eluiert. Die ersten vier Säulenvolumen werden gesammelt.

Zur präparativen Aufarbeitung dienen eingeschlammte Säulen. Hierbei wurde die benötigte Cellulose im Fließmittel eingerührt und unter Vermeidung von Luftblasen in ein unten mit Watte verschlossenes Chromatographierohr eingefüllt. Der aufzutrennende Extrakt wurde entweder auf Cellulose aufgezogen (s. oben) oder in wenig Fließmittel gelöst an den Start der Säule gegeben. Als Fließmittel dienen:

- a) Methyläthylketon : Aceton : Wasser (15:5:2)
- b) Äthylacetat : Aceton : Wasser (4:5:1)
- c) i-Propanol : n-Butanol : Wasser (70:20:10)

Im Fraktionssammler wurden Fraktionen zu je 20 ml gesammelt. Den einzelnen Fraktionen wurden je 0,2 ml entnommen und nach 8.7.4. auf Cyanogenese getestet.

Kieselgel

Kieselgel zur Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) wird in Fließmittel eingeschlammte und unter Vermeidung von Luftblasen in ein unten mit Watte verschlossenes Chromatographierohr überführt. Als Fließmittel wurden verwendet:

- a) Dichlormethan : Methanol (2:1)
- b) Methyläthylketon : Aceton : Wasser (15:3:1)

Am Fraktionssammler werden Fraktionen zu je 20 ml gesammelt. Ihnen werden jeweils 0,2 ml entnommen und nach 7.4.4.3. auf Cyanogenese geprüft.

8.7.4. Detektion

Die Detektion wurde je nach Erforderlichkeit mit Sprühreagenzien, als Sandwich oder mittels Gläschentest durchgeführt.

Sprühreagenzien

Als Sprühreagenzien wurden verwendet:

für Celluloseschichten a) Benzidin¹/Trichloressigsäure
 b) Anilinphthalat

für Kieselgelschichten a) Vanillin/konz. Schwefelsäure
 b) Anisaldehyd/Schwefelsäure

Die Dünnschichtplatten wurden mit den jeweiligen Reagenzien besprüht und bei 110°C im Trockenschrank nachbehandelt.

"Sandwich-Verfahren"

Beim "Sandwich-Verfahren" werden Cyanglykoside direkt auf dem Dünnschicht- oder Papierchromatogramm durch enzymatisch freigesetzte Blausäure nachgewiesen.

Das Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel- oder Celluloseschicht) oder ein vom Papierchromatogramm abgeschnittener Streifen, der auf eine Glasplatte aufgeklebt wurde, wurde mit β -Glukosidase-Lösung¹ besprüht. Danach wurde die noch feuchte Schicht mit Gaze abgedeckt und mit Reagenzpapier² und einer zweiten Glasplatte zum "Sandwich" verschlossen.

¹ Zur Gefährlichkeit von Benzidin s. Fußnote 3.1.1.4.

[•] 1mg β -Glukosidase reinst (Serva) wird in 1ml McIlvain-Puffer pH 5,5 gelöst.

² Feigl-Anger-Papier (TANTISEWIE et al. 1969)

Nach einer Reaktionsdauer von einer bis zwei Stunden zeigen blaue Flecken auf dem Reagenzpapier die Position der Cyanoglykoside an. Die Erfassungsgrenze liegt bei etwa 50 ng Blausäure. Im durchscheinenden Licht werden diese Stellen von hinten auf der Dünnschichtplatte bzw. auf der Trägerplatte für Papierchromatogramme markiert.

Gläschentest

Die den nach 7.4.3. erhaltenen Fraktionen entnommenen Proben werden in kleinen Schnappdeckelgläschen (5-10 ml) im Luftstrom zur Trockne eingeengt. Bei der Prüfung von Papierchromatogrammen werden vom Rand des Chromatogramms etwa 1 cm² große Stücke abgeschnitten und in Schnappdeckelgläschen überführt. Die so vorbereiteten Gläschen werden mit 2 Tropfen β -Glukosidase* beschickt und nach Einhängen eines Streifens Reagenzpapier** verschlossen. Es ist darauf zu achten, daß das Reagenzpapier nicht feucht wird. Nach ein bis vier-stündigem Stehen bei Raumtemperatur zeigt Blaufärbung des Reagenzpapiers die Anwesenheit von Blausäure.

8.8. Flüssigkeitschromatographische Systeme für Cyanolipide

8.8.1. Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase : Kieselgel

- a) Fertigplatten (Merck, Darmstadt)
- b) selbstgestrichene Platten (Kieselgel GF₂₅₄ nach Stahl (Typ 60) z.DC) mit 1 mm Schichten zur präparativen Auftrennung

Mobile Phase : a) Benzol
b) Hexan : Diäthyläther (3:1)

Laufstrecke : 10 cm

*1mg β -Glukosidase reinst (Serva) wird in 1ml McIlvaine-Puffer pH 5,5 gelöst

** Feigl-Anger-Papier (TANTISEWIE et al. 1969)

8.8.2. Säulenchromatographie

Kieselgel zur Säulenchromatographie (Typ 60, Merck, Darmstadt) wird in Fließmittel angeschlämmt und unter Vermeidung von Luftblasen in ein unten mit Watte verschlossenes Chromatographierohr eingefüllt. Nach 8.2.2. gewonnenes Samenöl wird in wenig Fließmittel gelöst und an den Start der Säule gegeben. Als mobile Phase dient Hexan : Diäthyläther (2:1). Das Eluat wird am Fraktionssammler in Fraktionen zu je 20 ml aufgefangen. Zur Detektion werden von jeder Fraktion 0.5 ml eingesetzt.

8.8.3. Hochdruckflüssigchromatographie von Cyanolipiden

Bedingungen

Pumpe	: Waters 6000 A
Schreiber	: Waters
Säule	: μ -Bondapak C-18, Waters
Fließmittel	: Acetonitril : Methanol (85:15)
Durchflußrate	: 2 ml/min
Injektor	: Waters Model U6K
Detektor	: Refraktationsindex (RI), Waters R 401
Papiervorschub	: 5 cm/h und 10 cm/h
Einspritzmenge	: 1 μ l bis 75 μ l 10 % Lösung in CCl_4 oder Fließmittel
Fraktions-	
sammler	: Freiprogrammierbare Probensammeleinrichtung für Hochdruckflüssigchromatographie, Siemens

Präparative HPLC

Das nach 8.2.2. gewonnene Samenöl wurde 10%ig in CCl_4 gelöst und zur HPLC eingesetzt. Anhand eines Probelaufes wurde der Fraktionssammler "live" programmiert. Das Programm wurde während des Sammelns laufend überwacht.

Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Aufgrund der geringen Abweichungen der Brechungsindizes (s.8.19.) der einzelnen Cyanolipidfraktionen konnte die Auswertung der gemessenen Signalf Flächen anhand der "100%-Methode" (KAISER 1965) vorgenommen werden. Das Ausmessen der Peakflächen erfolgte mit einem Handplanimeter (s.8.11.1.).

8.8.4. Detektionsmethoden

Zur Lokalisation der Flecken auf Dünnschichtchromatogrammen wurden diese entweder im Gegenlicht betrachtet, in eine Kammer mit Jodathmosphäre eingestellt oder aber mit 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung (0,1 % im Äthanol) besprüht und nach Abdampfen des Lösungsmittels im UV-Licht bei 254 nm betrachtet.

Zur Auffindung der cyanogenen Lipide wurden die Flecken ausgekratzt, mit Petroläther vom Sorbens eluiert und im Luftstrom in kleinen Schnappdeckelgläschen zur Trockne eingengt. Aliquote Teile der nach 8.8.2. und 8.8.3. gewonnenen Fraktionen wurden sinngemäß ebenso behandelt. Die Lipide wurden mit 1 ml 0,5 N äthanolischer KOH im Trockenschrank bei 100°C eine Stunde lang hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 1 ml 2 n Schwefelsäure versetzt. Freiwerdende Blausäure konnte analog 8.7.4. mit Reagenzpapier nachgewiesen werden.

8.9. Dünnschichtchromatographie von 2-Methylpropanol

Zur Dünnschichtchromatographie wurde 2-Methylpropanol zum Phenylhydrazon umgesetzt (KALLIO 1972). Dazu wurde zu dem nach erhaltenen Ansatz (Volumen 0,5 ml) 1 ml Dinitrophenylhydrazin-Reagenz* und 5 Tropfen konz. Salzsäure gegeben. Nach drei Stunden wurde zweimal mit je

*Gesättigte Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon in 2 n HCl

2 ml Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten Benzolphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

Stationäre Phase : Kieselgelfertigplatten (Merck)
Mobile Phase : a) Petroläther : Diäthyläther (70:30)
b) Chloroform : Benzol (50:50)
c) Chloroform : Petroläther* (75:25)
Laufstrecke : 10 cm
Detektion : a) Eigenfarbe
b) Besprühen mit methanolischer Kalilauge
c) Betrachten mit UV-Licht bei 254 nm

8.10. Dünnschichtchromatographie von Glukose

Die Dünnschichtchromatographie von Glukose erfolgte nach WIEHLE und HORAK (1972).

Stationäre Phase : Kieselgelfertigplatten (Merck)
Mobile Phase : Acetonitril : Schwefelkohlenstoff : Wasser
(85 : 5 : 10)
Laufstrecke : 10 cm; mehrmals, mindestens dreimal,
entwickeln
Detektion : a) Vanillin/Schwefelsäure
b) Anisaldehyd/Schwefelsäure
c) Thymol/Schwefelsäure

8.11. Gaschromatographie von Cyanglykosiden

Gerät : Varian Aerograph Modell 1200
Schreiber: Varian Aerograph 20, 1mV - Einkanal - Pultschreiber

* Siedebereich 40 bis 60°C

8.11.1. Qualitative GC

Bedingungen

Säulen : OV1 OV 17 OV 225
jeweils 3 % auf Chromosorb HP AW/
DMCS 80 - 100 mesh, Stahl 3 m x
2 mm i. D.

Temperatur-
programme : 175^o - 210^oC 170^o - 210^oC 170^o - 220^oC
jeweils 1^oC/min.

Trärgas : Stickstoff 30 ml/min

Empfindlich-
keit : 2×10^{-10} mA bis 8×10^{-10} mA

Injektor : 250^oC 250^oC 250^oC
Detektor : 320^oC 320^oC 320^oC
FID FID FID

Papiervor-
schub : 10"/h

Derivatisierung der Proben

0,1 - 3 mg Glykosid oder ein aliquoter Teil der nach 8.2.4. erhaltenen Extrakte wurden in 0,7 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und nacheinander mit 0,2 ml Hexamethyldesilazan (HMDS) und 0,1 ml Trimethylchlorsilan (TMCS) versetzt und 30 sec. geschüttelt. Nach mindestens fünfminütigem Stehen bei Raumtemperatur wurden zwischen 0,1 und 2 μ l zur Gaschromatographie injiziert.

Additionsanalysen

Bei Additionsanalysen wurde der nach 7.9.1.2. derivatisierten Probe in der Injektionsspritze die vermutete silylierte Substanz zugefügt.

8.11.2. Quantitative GC

Bedingungen

Es wurde an der in 7.8.1.1. genannten OV 1 - Säule mit folgendem Temperaturprogramm gearbeitet:

175°C - 215°C 1/grd/min., dann 4 grd/min bis 260°C.

Alle übrigen Parameter entsprachen den in 8.11.1.1. angegebenen Bedingungen.

Bestimmung des Standardkorrekturfaktors

Zur quantitativen gaschromatographischen Bestimmung von Cardiospermin wurde Triphenylbenzol (TPB) als innerer Standard verwendet. Aus Modellansätzen ergaben sich folgende Standardkorrekturfaktoren:

0,86; 0,86; 0,85; , 0,81; 0,80; 0,79; 0,86

$n = 9$; $\bar{x} = 0,83$; $s = \pm 0,03 \hat{=} 3,56 \%$

Bei der Ermittlung dieser Standardkorrekturfaktoren wurden Gemische von 0,4 bis 200 mg Cardiospermin und TPB silyliert und zur Gaschromatographie eingesetzt. Die Signalflächen der Chromatogramme wurden mit einem Planimeter (Typ 10, A. Ott, Kempten) mehrfach ausgemessen, bis drei Werte um nicht mehr als eine Noniuseinheit (NE) vom Mittelwert abweichen. Die Flächen wurden in NE ausgedrückt, wobei 1 NE einen absoluten Wert von 10 mm² hat. Alle Flächenmessungen wurden nach dieser Methode durchgeführt.

Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes

0,40; 0,80; 1,00 und 2,00 mg Cardiospermin, genau gewogen (Mikrofeinwaage), wurden zur Aufreinigung nach 8.2.4. eingesetzt. Die Wiederfindungsrate lag bei:

72,3 %; 69,9 %, 71,8 % und 71,55 %

$n = 4$; $\bar{x} = 71,4 \%$, $s = \pm 1,04 \hat{=} 1,46 \%$.

8.12. Gaschromatographie von 2-Methylpropanal

Von dem nach 8.6. erhaltenen Ansatz wurden 1 bis 2 μ l zur Gaschromatographie eingesetzt. Als Vergleichssubstanz diente käuflicher 2-Methylpropanal (Roth, Karlsruhe). Additionsanalysen wurden analog 7.8.1.3. durchgeführt.

Säule : FFAP 10 % auf Gaschrom Q
Stahl, 5 m x 2 mm i.D.

Ofentemperatur : 120°C isotherm
Trärgas : Stickstoff, 30 ml / min.
Injektor : 150°C
Detektor : 170°C, FID
Empfindlichkeit : 4×10^{-10} mA

8.13. Gaschromatographie von Fettsäuren

8.13.1. 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure

GC Bedingungen

Säule : FFAP 10 % auf Gaschrom Q
Stahl, 5 m x 2 mm i. D.

Ofentemperatur : 120°C isotherm
Trärgas : Stickstoff, 30 ml/min
Injektor : 150°C
Detektor : 160°C, FID
Empfindlichkeit : 4×10^{-10} mA

Derivatisierung

Der nach 8.6. erhaltene Ansatz wurde mit Benzol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde am VRV auf etwa 1 ml eingengt und mit 25 mg (-)Menthol und einer Spur p-Toluolsulfonsäure versetzt. Nach 12-stündigem Kochen am Rückfluß

wurde die wiedererhaltete Lösung direkt zur Gaschromatographie eingesetzt.

8.13.2. Fettsäuren aus Cyanolipiden

GC-Bedingungen

Säule : FFAP 10 % auf Chromosorb HP AW/DMCS
Stahl 5 m x 2 mm i. D.
Ofentemperatur : 155 °C isotherm
Injektor : 160 °C
Detektor : 160 °C, FID
Trärgas : Stickstoff, 30 ml / min
Empfindlichkeit : 4×10^{-10} mA

Derivatisierung der Proben

Zwischen 1 und 10 mg der nach 7.11.2. erhaltenen freien Fettsäuren werden in 0,5 ml N,N-Dimethylacetamid (DMA) gelöst, mit 0,2 ml Tetramethylammoniumhydroxid (TMA) (0,1 N in i-Propanol/Methanol 1:1) eine Minute geschüttelt und mit 0,1 ml Methyljodid versetzt. Nach etwa 10 min. werden zwischen 1 und 5 l des Überstandes zur Gaschromatographie eingesetzt.

Quantitative Gaschromatographie

Die quantitative Auswertung der Signalflächen erfolgte anhand der 100 %-Methode nach Kaiser (1965). Aufgrund der ähnlichen atomaren Zusammensetzung der eingesetzten Fettsäuremethylester konnte auf die Erstellung von Korrekturfaktoren verzichtet werden.

8.14. Gaschromatographie von Glukose

GC-Bedingungen

Säule : ECNSS - M 3 % auf Chromosorb AW/DMCS
Stahl, 2,50 m x 2 mm i. D.
Ofentemperatur : 195 °C isotherm

Injektor : 210°C
Detektor : 230°C, FID
Trärgas : Stickstoff, 30 ml/min
Empfindlichkeit : 4×10^{-10} mA

Derivatisierung

Etwa 1 mg Glukose wurde in 1 ml Wasser gelöst, mit einer Spaltelspitze Natriumborhydrid versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Überschüssiges Natriumborhydrid wurde durch tropfenweisen Zusatz von Eisessig hydrolysiert und der Ansatz 5 x mit je 2 ml Methanol am VRV zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand in 0,5 ml Pyridin aufgenommen und mit 0,5 ml Acetanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde lang auf 100°C erhitzt. Nach Zugabe von 5 ml Wasser wurde der Ansatz gefriergetrocknet, in 0,5 ml Chloroform aufgenommen und filtriert. Zwischen 1 und 5 μ l wurden zur Gaschromatographie eingesetzt.

8.15. Bestimmung des molaren Verhältnisses von Cyanid zu Glukose im "polaren Cyanglykosid" aus C. grandiflorum

Es wurden 30 μ l, 50 μ l und 80 μ l einer Glykosidlösung zur enzymatischen Blausäurebestimmung eingesetzt (s.8.3.3.)
Ergebnisse: 0,5 μ g, 0,7 μ g und 1,4 μ g Blausäure. In 100 μ l der Lösung sind also 1,8 μ g Blausäure $\hat{=}$ 69 nmol enthalten.

100 μ l der oben verwendeten Glykosidlösung wurden am VRV zur Trockne eingeengt und mit 2,5 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und Schwefelsäure (20 %) drei Stunden lang am Rückfluß gekocht. Der Ansatz wurde dann unter Eiskühlung mit 5 ml einer Lösung von Anthron in konz.

Schwefelsäure (0,2 %ig) versetzt und 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach erneutem Abkühlen in Eis wurde die Extinktion der grünen Lösung bei 620 nm gegen einen Blindwert gemessen. Die Glukosekonzentration wurde anhand einer Eichkurve ermittelt.

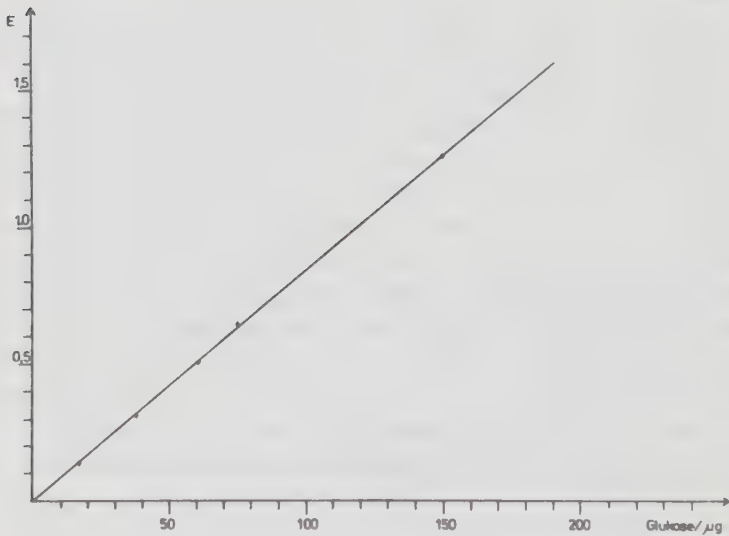


Abbildung 62: Eichgerade für Glukose

Ergebnisse: 144, 0 nmol, 155,6 nmol und 131,1 nmol. Nach den oben ermittelten Daten sind in 100 l Glykosidlösung 69 nmol Cyanid enthalten. Das molare Verhältnis von Cyanid zu Glukose beträgt demnach: 1 : 2,09; 1 : 2,26; 1 : 1,90 mit einem Mittelwert von 1 : 2,08.

8.16. Hydrierung von Proacacipetalin

Die Hydrierung erfolgte in absolutem Äthanol bei Raumtemperatur und einem H_2 -Druck von 50 bar. Als Katalysator diente Palladium (10 % auf Aktivkohle).

8.17. Darstellung von 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure

4,81 g L (+)-Valin wurden in 80 ml 2 N Schwefelsäure gelöst. Dazu wurde unter Rühren und Eiskühlung 4,5 g einer gesättigten Natriumnitritlösung getropft. Der Ansatz wurde bei 0°C drei Stunden lang gerührt, danach weitere drei Stunden bei Raumtemperatur (20°C). Die entstandene 2-Hydroxy-3-methylbuttersäure wurde mit 3 x 100 ml Diäthyläther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherauszüge über Natriumsulfat getrocknet und am VRV zur Trockne eingengt. Als Rückstand blieb ein gelbes Öl, welches nicht kristallisierte. Es wurde in 100 ml Wasser aufgenommen und mit 10 g Zinksulfat 6 h am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde filtriert, das Filtrat mit 9 N Schwefelsäure angesäuert und 3 x mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am VRV solange eingengt, bis eine größere Menge Kristallisates ausfiel. Nach 12-stündigem Stehen bei -20°C wurden die Kristalle abgesaugt und mit wenig kaltem Äther gewaschen. Die erste Kristallisation wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

Optische Drehung

Gerät	: Zeiß Polarimeter 0,01 °, Zeiß, Oberkochen
Schichtdicke	: 10 cm
Lösungsmittel	: Chloroform
Temperatur	: 18°C
Konzentration	: 12,998 %
Lichtquelle	: D-Linie des Natriumlichtes
Ermittelter	
Winkel	: $\alpha = - 2,55^\circ$

$$[\alpha]_D^{18} = -19,6^\circ$$

Literaturwerte : $[\alpha]_D^{18} = -19,4^\circ \pm 2,1^\circ$ (FARMER 1947)

$[\alpha]_D^{18} = -19,9^\circ \pm 1,8^\circ$ (COOK et al. 1949)

Bestimmung des Schmelzpunktes

Gerät : Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr.
Tottoli (Büchi, Flawil, Schweiz)

Schmp. : 64 - 64,5°C

Literatur-

werte : 65 - 66°C (FARMER 1947)

64,5°C (COOK et al. 1949)

8.18. Schmelzpunkt und optische Drehung von acetyliertem Heterodendrin und Cardiospermin

Acetylierung

10 mg Glykosid wurden in 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Pyridin und Eisessig gelöst und 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde mehrmals unter Zusatz von Benzol/Methanol (1:1) am VRV abgedampft. Der Rückstand wurde in wenig 50 %igem Methanol gelöst und bis zur Kristallisation bei -20°C aufbewahrt. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit eiskaltem Methanol (50 %) gewaschen und aus 50 %igem Methanol umkristallisiert.

Optische Drehung

Gerät : Perkin - Elmer 141 Polarimeter

Lichtquelle: D-Linie des Natriumlichtes

Temperatur : 20°C (Thermostat)

Lösungs-

mittel : Methanol

Schicht-

dicke : 10 cm

Konzentra-

tion : Heterodendrin-Acetat : 1,42 %

Cardiospermin-Acetat : 0,71 %

Abgelesener Winkel: Heterodendrin-Acetat : $\alpha = -0,365^{\circ}$

Cardiospermin-Acetat : $\alpha = -0,205^{\circ}$

Heterodendrin-Acetat: $[\alpha]_D^{20} = -37,06^{\circ}$

Cardiospermin-Acetat: $[\alpha]_D^{20} = -28,87^{\circ}$

Schmelzpunkt

Gerät : Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli,
(Büchi, Flawil, Schweiz)

Schmelz-

punkte : Heterodendrin-Acetat: $106^{\circ} - 108^{\circ} \text{ C (Korr.)}$

Cardiospermin-Acetat: $101^{\circ} - 102,5^{\circ} \text{ C (Korr.)}$

8.19. Brechungsindex der Cyanolipidfraktionen

Es wurden die Brechungsindices der Fraktionen 4 und 5 (s.4.3.3. und 5.3.3.) bestimmt. Der Brechungsindex der Frktion 6 konnte wegen der geringen Menge nicht ermittelt werden.

Gerät : Abbe Refraktometer (Zeiß, Oberkochen)

Temperatur: 24° C

Licht-

quelle : D-Linie des Natriumlichtes

Brechungs-

index : Fraktion 4 : 1,4689

Fraktion 5 : 1,4677

8.20. Molekulargewichtsbestimmung von Heterodendrin

Gerät : Hitachi - Perkin - Elmer Dampfdurchosmo-
meter 115

Lösungs-

mittel : Methanol

Temperatur: oberer Ofen : $40,5^{\circ} \text{ C}$

unterer : $39,0^{\circ} \text{ C}$

Raumtem-
peratur : 20°C
Abgleich-
zeit : 10 min
Schreiber : Hitachi - Perkin - Elmer 1 mV 1 Kanalschreiber
Papiervor-
schub : 10 cm/min
Eichsub-
stanz : 4-Dimethylaminobenzaldehyd

Molekulargewicht von Heterodendrin: gefunden: 263,7
theoretisch: 261,14

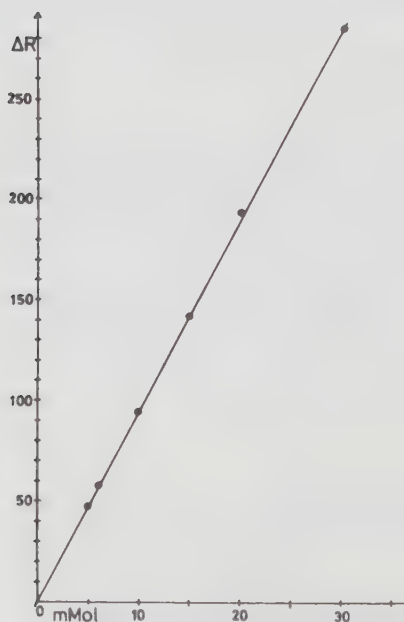


Abbildung 63: Eichgerade von Dimethylaminobenzaldehyd

8.21. Infrarotspektroskopie

Glykoside (1-2 mg) wurden mit 200 mg trockenen Kaliumbromid für die Spektroskopie gut verrieben und zu einem Preßling geformt. Cyanolipide und Samenöle wurden als Film auf Natriumchloridscheiben aufgebracht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Perkin - Elmer - Spektrometer Modell 257.

8.22. ^1H -Kernresonanzspektroskopie

Bedingungen

Geräte : Varian T 60 NMR (60 MHz Spektren)
Bruker HX 180 (180 MHz-FT-Spektren)

Lösungs-

mittel : CCl_4
Methanol- d_4
 D_2O
 DMSO-d_6
Chloroform- d_3

Referenz-

signale : TMS ($\delta = 0,00$ ppm)
 CH_3OD ($\delta = 3,33$ ppm)

Probenkon-

zentra-

tionen : 20 bis 50 mg/ml bei 60 MHz-Spektren
2 bis 10 mg/ml bei 180 MHz-FT-Spektren

Derivatisierung der Proben

Teilweise wurden die Cyanglykoside als TMS-Äther zur NMR-Spektroskopie eingesetzt. Hierzu wurden 20 bis

50 mg Glykosid in 1 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen und mit je 0,5 ml Hexamethyldisilazan und Trichlormethylsilan versetzt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 12 h stehen gelassen und dann nach Zugabe von 3 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff am VRV zur Trockne eingengt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt (drei- bis fünfmal), bis alles Pyridin entfernt war. Die in 0,5 ml C_6H_6 aufgenommene Substanz wurde dann durch eine Fritte (G 4)⁴ filtriert. Nach mehrmaligem Nachspülen mit insgesamt 0,5 ml CCl_4 wurde die soerhaltene Lösung zur NMR-Spektroskopie verwendet.

9. ANHANG

pH	CN ⁻ / nmol
3,52	16,3
4,00	33,1
4,23	67,8
4,47	78,8
4,88	44,2
5,52	16,3
6,02	38,5
6,41	74,0
6,85	117,3
6,98	136,7
7,13	165,4
7,19	103,8

pH	4-NPG/nmol
3,44	7,5
3,92	50,5
4,19	64,5
4,53	72,5
4,88	64,3
5,57	93,8
6,09	105,4
6,49	82,0
6,94	84,6
7,11	99,0
7,27	115,2
7,39	98,0

Tabelle 13: Aktivität der Enzympräparation aus *C. grandiflorum* gegen Cardiospermin und 4-NPG in Abhängigkeit vom pH-Wert

Prob.-Nr.	Trockengewicht in mg		
	Knospen Blüten Früchte	Frucht- wände	Samen
8	3,6	-	-
9	5,0	-	-
10	4,3	-	-
11	21,8	18,6	1,2
13	205,0	181,0	24,0
14	556,4	162,2	156,6
17	521,0	167,0	126,4

Tabelle 14: Trockengewicht von Knospen, Blüten, Früchten

obere Blätter	CN ⁻	
	μmol/g TG	μmol/Blatt
Br0 1	118,8	1,39
Br0 2	91,7	1,00
Br0 3	47,0	0,72
Br0 4	42,3	0,85
Br0 5	48,4	1,31
Br0 6	73,5	1,98
Br0 7	83,6	1,67
Br0 9	93,7	0,94
Br0 10	120,6	1,08
Br0 11	115,2	1,20
Br0 12	116,7	1,23
Br0 13	143,8	1,31
Br0 14	200,0	1,60
Br0 15	145,5	2,04
Br0 16	121,0	2,18
Br0 17	87,1	1,31
Br0 18	72,7	1,09
Br0 19	88,1	0,98
Br0 20	147,9	1,33

Tabelle 15: Cyanidgehalt von jungen Blättern (Br0)
bezogen auf Trockengewicht und Organ

mittlere Blätter	CN ⁻	
	umol/g TG	umol/Blatt
BrM 1	80,4	6,63
BrM 2	33,2	2,40
BrM 3	24,7	2,27
BrM 4	20,7	2,04
BrM 5	42,8	5,30
BrM 6	39,4	12,69
BrM 7	18,9	8,08
BrM 9	17,9	3,88
BrM 10	19,0	2,65
BrM 11	26,3	5,85
BrM 12	21,0	6,41
BrM 13	16,2	6,85
BrM 14	26,4	4,88
BrM 15	37,2	3,54
BrM 16	21,3	3,75
BrM 17	28,5	8,77
BrM 18	25,1	5,15
BrM 19	25,0	5,15
BrM 20	192,9	4,04

Tabelle 16: Cyanidgehalt mittlerer Blätter (BrM),
bezogen auf Trockengewicht und Organ

untere Blätter	CN ⁻	
	/μmol/g TG	/μmol/Blatt
BrU 1	38,2	3,43
BrU 2	29,9	12,73
BrU 3	12,7	1,34
BrU 4	8,7	0,62
BrU 5	6,08	0,69
BrU 6	9,0	0,69
BrU 7	3,4	0,54
BrU 9	9,8	0,94
BrU 10	32,8	3,0
BrU 11	41,3	4,13
BrU 12	17,4	1,48
BrU 13	9,9	0,9
BrU 14	9,4	1,04
BrU 15	11,1	1,07
BrU 16	7,2	0,88
BrU 17	17,4	2,85
BrU 18	21,7	2,69
BrU 19	24,1	2,22
BrU 20	46,9	3,08

Tabelle 17: Cyanidgehalt alter Blätter (BrU),
bezogen auf Trockengewicht und Organ

Sproßachse oben	CN ⁻	
	µmol/g TG	µmol/cm
SpO 2	57,8	1,93
SpO 4	71,0	0,54
SpO 6	14,8	0,19
SpO 9	18,4	0,23
SpO 11	21,2	0,25
SpO 13	14,1	0,23
SpO 15	5,65	0,12
SpO 17	67,5	0,54
SpO 18	95,1	1,15
SpO 19	12,6	0,13
SpO 20	21,4	0,18

Tabelle 18: Cyanidgehalt des oberen Sproßachsenabschnittes (SpO), bezogen auf Trockengewicht und Längeneinheit

Sproßachse Mitte	CN ⁻	
	µmol/g TG	µmol/cm
SpM 2	20,4	0,10
SpM 4	21,4	0,19
SpM 6	15,8	0,29
SpM 9	38,6	0,86
SpM 11	53,5	0,55
SpM 13	97,2	2,20
SpM 15	59,2	2,21
SpM 17	50,4	1,50
SpM 18	42,4	1,25
SpM 19	30,0	0,90
SpM 20	40,0	1,60

Tabelle 19: Cyanidgehalt des mittleren Sproßabschnittes (SpM), bezogen auf Trockengewicht und Längeneinheit

Sproßachse unten	CN ⁻	
	/µmol/g TG	/µmol/cm
SpU 2	18,9	0,21
SpU 4	50,2	0,64
SpU 6	53,5	1,17
SpU 9	103,3	3,20
SpU 11	80,3	3,09
SpU 13	49,9	5,12
SpU 15	35,8	2,36
SpU 17	22,5	1,05
SpU 18	29,0	1,38
SpU 19	50,3	3,31
SpU 20	87,1	13,2

Tabelle 20: Cyanidgehalt des unteren Sproßachsenabschnittes (SpU), bezogen auf Trockengewicht und Längeneinheit

Wurzel	CN ⁻
	/µmol/g TG
W 2	11,2
W 4	20,3
W 6	18,3
W 9	28,8
W 11	45,9
W 13	30,5
W 15	13,8
W 17	44,4
W 18	30,9
W 19	22,2
W 20	22,5

Tabelle 21: Cyanidgehalt der Wurzel (W), bezogen auf Trockengewicht

Knospen Blüten Früchte	CN ⁻	
	/umol/g TG	/umol/Stck
Kn 8	86,3	0,31
Kn 9	86,5	0,43
Fr 10	123,6	0,53
Fr 11	113,1	2,47
Fr 13	45,6	6,12
Fr 14	4,0	0,66
Fr 17	2,1	0,28

Tabelle 22: Cyanidgehalt von Knospen (Kn), Blüten (Bn) und Früchten (Fr), bezogen auf Trockengewicht und auf Organ

Frucht- wände	CN ⁻	
	/umol/g TG	/umol/Stck
FrW 11	117,3	2,18
FrW 13	37,7	6,82
FrW 14	4,1	0,67
FrW 17	1,1	0,18

Tabelle 23: Cyanidgehalt der Fruchtwände (FrW), bezogen auf Trockengewicht und Organ

Samen	CN ⁻ (glykosidisch)		Cyanolipide	
	/umol/g TG	/umol/Stck	/umol/g TG	/umol/Stck
Sa 11	92,9	0,11	-	-
Sa 13	77,9	0,65	-	-
Sa 14	3,2	0,53	114,0	18,9
Sa 17	2,5	0,32	165,8	21,0

Tabelle 24: Gehalt der Samen (sa) an glykosidisch gebundenen Cyanid und Cyanolipiden, bezogen auf Trockengewicht und Organ

obere Blätter	/umol/Blatt		/umol/g TG	
	Cardiospermin	pol. Glykosid	Cardiospermin	pol. Glykosid
BrO 1	0,93	0,46	77,9	41,01
BrO 2	0,36	0,64	32,81	58,89
BrO 4	0,26	0,59	12,86	29,44
BrO 6	1,22	0,76	45,32	28,18
BrO 10	1,08	-	120,6	-
BrO 12	1,23	-	116,7	-
BrO 14	1,60	-	200,0	-
BrO 16	1,00	1,18	55,66	65,34
BrO 17	0,66	0,65	44,23	42,87
BrO 18	0,44	0,65	29,08	43,62
BrO 20	0,15	1,18	16,27	131,63

Tabelle 25: Cyanglykosidgehalt der oberen Blätter (BrO), bezogen auf Organ und Trockengewicht

untere Blätter	/umol/Blatt		/umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
BrU 1	0,38	3,05	4,20	33,99
BrU 3	0,50	0,81	4,57	8,16
BrU 5	0,16	0,53	2,38	6,66
BrU 10	0,85	2,15	9,41	23,40
BrU 12	0,38	1,10	4,57	12,81
BrU 14	0,24	0,80	2,18	7,22
BrU 16	0,15	0,73	1,17	5,98
BrU 18	0,42	2,27	3,38	18,31
BrU 19	0,69	1,53	3,74	20,38
BrU 20	0,57	2,51	4,22	42,66

Tabelle 26: Cyanglykosidgehalt der unteren Blätter (BrU), bezogen auf Organ und Trockengewicht

Sproß oben	/umol/cm		/umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
SpO 2	1,50	0,43	44,0	13,8
SpO 4	0,40	0,14	52,3	18,7
SpO 6	0,14	0,05	10,9	3,9
SpO 11	0,25	-	21,2	-
SpO 15	0,12	-	5,65	-
SpO 17	0,54	-	67,5	-
SpO 18	1,21	-	95,1	-
SpO 19	0,13	-	13,3	-
SpO 20	0,13	0,05	15,5	5,9

Tabelle 27: Cyanglykosidgehalt des oberen Sproßabschnittes (SpO), bezogen auf Längeneinheit und Trockengewicht

Sproß unten	/umol/cm		/umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
SpU 2	0,16	0,05	14,3	4,6
SpU 6	0,97	0,2	44,4	9,1
SpU 9	3,20	-	103,3	-
SpU 11	3,09	-	80,3	-
SpU 15	2,36	-	35,8	-
SpU 18	1,25	0,13	26,3	2,7
SpU 20	11,78	1,42	77,7	9,4

Tabelle 28: Cyanglykosidgehalt des unteren Sproßab-
schnittes (SpU), bezogen auf Längeneinheit
und Trockengewicht

Wurzel	/umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol Glykosid
W 2	6,70	4,50
W 6	11,69	6,58
W 11	31,20	14,68
W 15	11,59	2,18
W 17	34,88	9,50
W 20	22,28	0,18

Tabelle 29: Cyanglykosidgehalt der Wurzel (W),
bezogen auf Trockengewicht

Knospen Blüten Samen	umol/Organ		umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
Kn 8	0,32	-	86,3	-
Bn 9	0,31	0,12	62,3	24,2
Fr 10	0,39	0,14	90,7	32,9
Fr 11	1,55	0,92	97,3	15,8
Fr 13	5,64	0,48	36,4	9,2
Fr 14	0,57	0,09	3,46	0,54
Fr 17	0,28	-	2,05	-

Tabelle 30: Cyanglykosidgehalt von Knospen (Kn),
Blüten (Bn) und Früchten (Fr), bezogen
auf Organ und Trockengewicht

Frucht- wand	umol/Organ		umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
FrW 11	1,80	0,38	89,1	19,2
FrW 13	6,30	0,52	30,9	6,8
FrW 14	0,67	-	4,1	-
FrW 17	0,18	-	1,1	-

Tabelle 31: Cyanglykosidgehalt der Fruchtwände (FrW),
bezogen auf Organ und Trockengewicht

Samen	/umol/Organ		/umol/g TG	
	Cardio- spermin	pol. Glykosid	Cardio- spermin	pol. Glykosid
Sa 11	0,11	-	89,0	-
Sa 13	0,65	0,23	77,9	27,7
Sa 14	0,53	0,13	3,2	0,8
Sa 17	0,32	-	2,5	-

Tabelle 32: Cyanglykosidgehalt der Samen (Sa), bezogen auf Organ und Trockengewicht

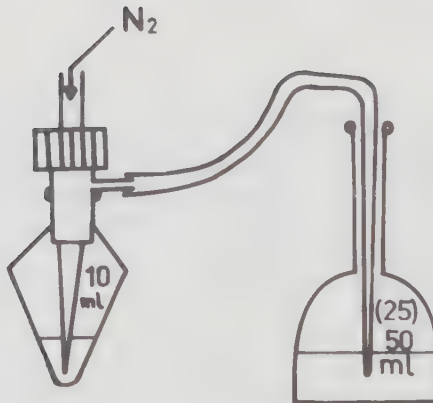


Abbildung 59: Cyanidbestimmungsapparatur

10. ZUSAMMENFASSUNG

Die vegetativen Teile von zehn Sapindaceen-Arten wurden auf Cyanogenese untersucht. Dabei erwiesen sich *Cardiospermum grandiflorum* Sw., *C. halicacabum* L. Amoen. und *Heterodendron oleaefolium* Desf. als deutlich cyanogen.

Aus Blättern und Zweigholz von *H. oleaefolium* wurden nach säulen- und papierchromatographischer Aufreinigung zwei Blausäureglykoside isoliert, die mittels ^1H -Kernresonanzspektroskopie und durch chemischen Abbau als 2- β -D-Glucopyranosyloxy-3-methylbutyronitril (Heterodendrin) und 2- β -D-Glucopyranosyloxy-3-hydroxymethylbutyronitril-3-en (Cardiospermin) geklärt wurden. Über sterisch kontrollierten Abbau und Gaschromatographie von Diastereomerenpaaren konnte die absolute Konfiguration am C-2 der Aglyka von Heterodendrin und in diesem Zusammenhang auch von Proacacipetalin ermittelt werden.

Die Cyanolipide der Samenöle von *H. oleaefolium* und *C. grandiflorum* wurden mittels Hochdruckflüssigchromatographie an Hand des Fettsäureanteils fraktioniert. Es konnte gezeigt werden, daß in die Cyanolipide beider Species bevorzugt Fettsäuren vom Typ $\text{C}_{18/1}$, $\text{C}_{20/0}$ und $\text{C}_{20/1}$ eingebaut werden. Die Zuordnungsmöglichkeit weiterer definierter Ester wird diskutiert.

An *C. grandiflorum* wurden während einer Vegetationsperiode ontogenetische Untersuchungen des Blausäuregehaltes vorgenommen. Hierzu wurde durch vegetative Vermehrung genetisch einheitliches Pflanzenmaterial angezogen. Es konnte festgestellt werden, daß die Pflanze während der gesamten Vegetationsperiode in allen Organen Blausäureglykoside enthält. Quantitative gaschromatographische Bestimmung des in *C. grandiflorum* bekannten Cyanoglykosides Cardiospermin zeigte, daß die Pflanze zu bestimmten Zeiten noch ein zweites Blausäureglykosid bildet.

Für diese Substanz - ein Derivat des Cardiospermin - wurden Daten zur Strukturaufklärung zusammengestellt. Cyanolipide ließen sich dagegen nur in den Samen feststellen. Hier nimmt ihre Konzentration in der späten Reifeperiode stark zu; dagegen fällt in Korrelation dazu der Cyanglykosidgehalt der Samen drastisch ab.

Aufgrund der erhaltenen Daten wird ein Transport der Cyanglykoside in der Pflanze verneint. Die Daten stehen im Einklang mit einer "de-novo-Synthese" der Glykoside und ihrer Umwandlung ineinander. Ob Cyanglykoside im Samen biogenetische Vorstufen für Cyanolipide darstellen, bleibt einer weiteren Bearbeitung vorbehalten.

11. LITERATURVERZEICHNIS

- ABICHT, M. (1976). Dissertation Saarbrücken
- ABROL, Y.P. und E.E. CONN (1966). Phytochem. 5, 237
- ABROL, Y.P., E.E. CONN und J.R. STOKER (1966). Phytochem. 5, 1021
- ACKER, L. (1968). Die Nahrung 12, 557
- ALDRIGE, W.N. (1944). Anal. 69, 262
- ANONYMUS (1973). Sci. Sinica 16, 506, zitiert n. Chem. Abs. 80, 112 554 s
- BALLESTER, A. und J.C. OVEREEN (1975). Phytochem. 14, 1667
- BELLAMY, L.J. (1966). Ultrarot Spektren und chemische Konstitution, Dr. Dietrich Steinkopf, Darmstadt
- BENNET, W.D. und B.A. TAPPER (1968). J. Chrom. 34, 428
- BERSIN, T. (1958). In: Handbuch d. Pflanzenphysiol. Bd. IX, p. 33, Springer Verlag Berlin
- BISHOP, J.A. und M.E. KORN (1969). Heredity 24, 423
- BISSET, F.M., R.C. CLAPP, R.A. COBURN, H.G. ETTLINGER und L. LONG jr. (1969). Phytochem. 8, 2235
- BISSET, N.G., A.K. CHOUDHURY und M.D. WALKER (1974). Phytochem. 13, 255
- BJÖRNDAL, H., C.G. HELLERQUIST, B. LINDBERG und S. SVENSSON (1970). Angew. Chemie 82, 643
- BLUMENTHAL, S. G., H.R. HENDRICKSON, Y.P. ABROL und E.E. CONN (1968). J. Biol. Chem. 243, 5302
- BORNEFF, J. (Hrsg.) (1973). Arbeitsmedizin in Vorlesungen F.K. Schattauer, Stuttgart, p. 246 und 264
- BOUGH, W.A. und J.E. GANDER (1971). Phytochem. 10, 67
- BUTLER, G.W., R.W. BAILEY und L.D. KENNEDY (1965) Phytochem. 4, 369
- BUTTERFIELD, C.S., E.E. CONN und D.S. SEIGLER (1975) Phytochem. 14, 993
- CANNY, M.J. (1971). Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 237
- CHARLES, D., Q.G. ALI und S.M. OSMANEN (1977) Chem. Ind. 7, 275
- COLE, R.A. (1975). Phytochem. 14, 2293
- COLE, R.A. (1976). Phytochem. 15, 759

- CONN, E.E. (1969). J. Agr. Food 17, 519
- CONN, E.E. und G.W. BUTLER (1969). In: J.B. HARBORNE und T. SWAIN (Hrsg.), Persp. of Phytoch. p 47, Acad. Press London
- CONN, E.E. (1973). Biochem. Soc. Symp. 38, 277
- CONNER, W.E., T.H. JONES, T. EISNER und J. MEINWALD (1977). Experienta 33, 206
- CONSUMERS Rep. Aug. 1977 p. 444. Zitiert nach Current Contents Nr. 42 (1977) p. 17
- COOK, A.H., S.F. COX und T.H. FARMER (1949). J. Chem. Soc. II, 1022
- COOPER-DRIVER, G.A. und T. SWAIN (1976). Nature 260, 604
- CORKILL, L. (1952) N. Z. J. Sci. Tech. A 34, 1
- CRAFORD-SIDEBOTHAM, T.J. (1972). Heredity 28, 405
- CZAPEK, F. (1925). Biochemie der Pflanzen Bd. III, 3. Aufl. Fischer Verlag Jena
- DELANGE, F., M. VAN DER VELDEN und A.M. ERMANS (1973). In: B. NESTEL und R. MCINTYRE (Hrsg.), Chronic Cassava Toxicity, Proc. of an Interdis. Workshop London
- DEMENT, W.A. und H.A. MOODEY (1974). Oecologia 15, 65
- DE WAAL, D. (1942). Thesis, Wageningen zitiert nach E.E. CONN, Biochem. Soc. Symp. 38, 277 (1973)
- DILLEMANN, G. (1958). In: W. RUHLAND (Hrsg.), Handb. d. Pflanzenphysiol. Bd. VIII, 1050, Springer Verlag Berlin
- DUNNILL, P.M. und L. FOWDEN (1965). Nature 208, 1206
- DWUMA-BADU, D., W.K. WATSON, E.M. GOPALAKRISHNA und T.U. OKARTER (1976). Lloydia 39, 385
- EISNER, H.E. EISNER, T. und J.J. HURST (1963a). Chem. Ind. 124
- EISNER, T., H.E. EISNER und J.J. HURST (1963b). Science 139, 1218
- EJYOLFSSON, R. (1968). Thesis, Kopenhagen
- EJYOLFSSON, R. (1971). Fort. d. Chem. org. Naturstoffe 27, 74

- EKPECHI, O.L. (1973). In: B. NESTEL und R. MCINTYRE
(Hrsg.), Chronic Cassava Toxicity, Proc.
Interdis. Workshop London
- ELLINGER, C.A., A.G. WAISS und R.E. LUNDIN (1973).
J. Chem. Soc. Perk. Trans. I 2209
- ELLINGER, C.A. (1974). Phytochem. 13, 2319
- ELLIS, W.E.; J.R. KEYMER; D.A. JONES (1977).
Experiente 33, 309
- ENGELHARD, H. (1977). Hochdruckflüssigchromatographie,
2. Aufl. Springer Verlag Berlin
- ETTLINER, M.G., J.W. JAROSZESWSKI, S.R. JENSEN, B.J.
NIELSEN und F. NARTEY (1977), J.C.S.
Chem. Com. 952
- FARMER, T.H. (1947). Sci. .Roy. Coll. Sci. 17, 27
zitiert nach Chem. Abs. (1948) 42, 2640
- FEIGL, F. und W. ANGER (1966). Anal. 91, 282
- FENSELAU, C., S. PALLANTE, R.P. BATZINGER, W.R. BENSON,
R.P. BARRON, E.B. SHEININ und M. MARIENTHAL
(1977), Science 198, 625
- FISCHER, E. und H. SCHEIBLER (1908). Ber. d. dtsh.
Chem. Ges. 41, 289
- FREUDENBERG, G.K. und F. RHINO (1942). Ber. d. dtsh.
Chem. Ges. 57, 1547
- FRITZ, E. und W. ESCHRICH (1970). Planta 92, 267
- GARNER, R.C., K.M. CANO, R.S. PEIMER und T.E. YESHION
(1976). J. Forens. Sci. 21, 816
- GIBBS, R.D. (1974). Chemotax. of Flowering Plants
B d. I, p. 58 McGill-Queen's University
Press Montreal
- GOWRIKUMAR, G. und V.V.S. MANI (1976). Phytochem. 15,
1566
- GRIMMER, G. (1955). Die gegenseitige Beeinflussung
höherer Pflanzen, Fischer Verlag Jena
- GUILBAULT, G.G. und D.N. KRAMER (1966). Anal. Chem.
38, 834
- HAHLBROCK, K. und E.E. CONN (1970). J. Biol. Chem.
245, 917
- HAHLBROCK, K. und E.E. CONN, (1971). Phytochem. 10,
1019

- HAISMANN, D.R. und D.J. KNIGHT (1967). Biochem. 103, 528
- HEGNAUER, R. (1973). Chemotaxonomie d. Pflanzen Bd VI,
Birkhäuser Verlag Basel
- HEGNAUER, R. (1977). Plant Syst. Evol. Suppl. 1, 191
- HILL, G.J., T.E. SHINE, H.J. HILL und C. MILLER (1976).
Cancer Res. 36, 2102
- HOPKINS, C.Y. und R. SWINGLE (1968). Lipids 2, 258
- HÖSEL, W. und A. NAHRSTEDT (1975). Hoppe-Seyler's Z.
f. Physiol. Chemie 356, 1265
- HÖSEL, W. und O. KLEWITZ (1977). Hoppe-Seyler's Z.
f. Physiol. Chemie 358, 959
- HUMBERT, J.R., J.H. TRESS und K.T. BRAICO (1977) J. Am.
Med. Ass. 238, 482
- JANAK, J. (1960). J. Chrom. 3, 308
- JENTZSCH, D. (1975). Gaschromatographie, Franckh'sche
Verlagsbuchhandlung Stuttgart
- JONES, D.A., J. PARSONS und D.M. ROTHSCILD (1962).
Nature 194, 52
- JONES, D.A. (1968). Heredity 23, 453
- JONES, D.A. (1972). In: HARBORNE, JEFFREY und BARRY (Hrsg.),
Phytochem. Ecology, Academic Press London
- JONES, D.A. (1973). In: V.H. HEYWOOD (Hrsg.), Taxonomy
and Ecology Academic Press London
- KAISER, R. (1965). Chromatographie in der Gasphase Teil
IV, Bibliographisches Institut Mannheim
- KAISER, R. und M. KLIER (1969). Chromatographie 2, 565
- KALLIO, H. (1972). J. Chrom. 65, 355
- KINGSBURY, J.M. (1964). Poisonous Plants of the United
States and Canada, p. 364, Prentice Hall
Canglewood Cliff N.Y.
- KOFOD, H. und R. EYJOLFSSON (1969). Phytochem. 8, 1509
- KRÖLLER, E. (1968). Z. Lebensm. Unters. Forsch. 136, 321
- KUNDU, M.K. und C. BANDYOPADHYAY (1969). J. Am. Oil Chem.
Soc. 46, 23
- KUNDU, M.K. (1970). J. Chrom. 46, 324

- LASTER, W.R. jr. und F.M. SCHNABEL jr. (1975). Cancer
Chemotherapy Rep. 59, 951
- LIEBIG, J. und F. WÖHLER (1837). Ann. Chim. Phys. 64,
185
- LIST, P.H. (1968). Dtsch. Apoth. Ztg. 108, 1524
- LOCHMÜLLER, C.H. und R.W. SOUTER (1975). J. Chrom.
113, 283
- LUCKNER, M. (1972). In: K. MACEK (Hrsg.), Pharmaceu-
tical Application of Thin Layer and Paper
Chromatographie, Elsevier Publishing Com-
pany, Amsterdam
- LÜDTKE, M. (1952). Biochem. Z. 322, 310
- LÜTTGE, U. (1973). Stofftransport d. Pflanzen p. 234,
Springer Verlag Berlin
- MAHADEVAN, S. (1973). Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 69
- MCFARLANE, J.J., E.M. LEES und E.E. CONN (1975). J.
Biol. Chem. 250, 4708
- MCLEOD A.J. und G. M. MCLEOD (1977). Phytochem. 16,
907
- MIGNAT, S. und F. PORSCH (o.J.). In: Pfefferminzöle
und Menthol p. 61, Firmenschrift d. Fa.
Dragoco, Holzminden
- MIKOLAJCZAK, K.L., D.S. SEIGLER, C.R. SMITH jr., J.A.
WOLFF und R.B. BATES (1969). Lipids 4, 617
- MIKOLAJCZAK, K.L., C.R. SMITH jr. und C.W. TJARKS (1970a).
Lipids 5, 672
- MIKOLAJCZAK, K.L., C.R. SMITH jr. und C.W. TJARKS (1970b).
Lipids 5, 812
- MIKOLAJCZAK, K.L., C.R. SMITH jr. und C.W. TJARKS (1970c).
Biochem. Biophys. Acta 210, 306
- MIKOLAJCZAK, K.L. und C.R. SMITH jr. (1971). Lipids 6, 349
- MOTHES, K. und A. ROMEIKE (1958). In: Handb. d. Pflanzen-
physiol. Bd. VIII p. 989, Springer Verlag
Berlin
- NAHRSTEDT, A. (1970a). J. Chrom. 50, 518
- NAHRSTEDT, A. (1970b). Phytochem. 9, 2085
- NAHRSTEDT, A. (1971). Dissertation Freiburg

- NAHRSTEDT, A. (1972). *Phytochem.* 11, 3121
- NAHRSTEDT, A. (1973). *Pharm. in uns. Zeit* 2, 147
- NAHRSTEDT, A. (1975a). *Arch. d. Pharm.* 308, 903
- NAHRSTEDT, A. (1975b). *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167, 597
- NAHRSTEDT, A. (1976). *Z. Naturforsch.* 31c, 397
- NAHRSTEDT, A. (1977). *Dtsch. Apoth. Ztg.* 117, 1357
- NESTEL, B. (1973). In: B. NESTEL und R. MCINTYRE (Hrsg.)
Chronic Cassava Toxicity, Proc.
Interdis. Workshop London
- NEUNHÖFFER, O. (1974). *Krebsgeschichten* 4, 96
- NORMANN, C. (1975). *Nature* 257, 637
- OSUNTOKUN, B.O. (1973). In: B. NESTEL und R. MCINTYRE
(Hrsg.) Chronic Cassava Toxicity,
Proc. Interdis. Workshop London
- PAECH, K. (1956). In: K. PAECH und M.V. TRACEY (Hrsg.)
Moderne Methoden der Pflanzenanalyse,
Springer Verlag Berlin
- PEI, P.T.-S., R.S. HENLEY und S. RAMACHANDRAN (1975).
Lipids 10, 152
- PETRIE, J.M. (1920). *Proc. Linn. Soc. N.S. Wales*
45, 447
- PIERCE, A.E. (1968). *Silylation of Organic Compounds.*
Pierce Chem. Comp., Rockford Ill.
- PLOUVIER, V. (1935). *C.r.hebd. Acad. Sci. Paris* 200,
1975, zitiert nach E.E. CONN und
G.W. BUTLER (1969)
- RADLKOFER, L. (1934). In: A. ENGLER (Hrsg.). *Das Pflanzen-*
reich, Verlag von Wilhelm Engelmann,
Leipzig
- RANDERATH, K. (1965). *Dünnschichtchromatographie*, Verlag
Neustadt/Weinstr.
- RIMINGTON, C. (1935). *Ond. J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 5, 445
- ROBINSON, M.E. (1930). *Biol. Rev.* 5, 126
- ROBINSON, T. (1963). *The organic Constituents of higher*
plants, p. 286, Burgess Publ. Comp.,
Minneapolis
- ROSENTHALER, L. (1920). *Schweiz. Apoth. Ztg.* 58, 17
- ROSENTHALER, L. (1923). *Biochem. Z.* 134, 225
- ROSENTHALER, L. (1932). In: *Handb. d. Pflanzenanalyse Bd.*
III/2, p. 1042, Springer Verlag Wien

- SARMA, P.S. und G. PADMANBAN (1969). In: J.E. LIENER (Hrsg.), Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, p. 267, Academic Press London
- SCHULZ, G. (1969). Z. Pflanzenphysiol. 61, 29
- SCHÜTTE, H.-R. (1973). Fort. d. Bot. 35, 101
- SCHRADER, J.C.K. (1803). Gilb. Ann. 13, 503
- SCHWARZMAIER, U. (1975). J. Chrom. 114, 235
- SEIFFERT, P. (1955). In: K. PAECH und M.V. TRACEY (Hrsg.), Moderne Methoden d. Pflanzenanalyse Bd. IV p.680, Springer Verlag Berlin
- SEIGLER, D.S., K.L. MIKOLAJCZAK, C.R. SMITH, I.A. WOLFF und R.B. BATES (1970). Chem. Phys. Lip. 4, 147
- SEIGLER, D.S., F. SEAMAN und T.J. MABRY (1971) Phytochem. 10, 485
- SEIGLER, D.S. (1974a). Phytochem. 13, 841
- SEIGLER, D.S., C. EGGERDING und D.C. BUTTERFIELD (1974b). Phytochem. 13, 2330
- SEIGLER, D.S. (1975a). Phytochem. Bull. 8, 6
- SEIGLER, D.S. (1975b). Phytochem. 14, 9
- SEIGLER, D.S., C.S. BUTTERFIELD, J.E. DUNN und E.E. CONN (1975c). Phytochem. 14, 1419
- SEIGLER, D.S. und C.S. BUTTERFIELD (1975d). Phytochem. 15, 842
- SEIGLER, D.S. und P.W. PRICE (1976a). Am. Natural. 110, 101
- SEIGLER, D.S. und C.S. BUTTERFIELD (1976b). Phytochem. 15, 842
- SEIGLER, D.S. und A.W. KAWAHARA (1976c). Biochem. Syst. Ecol. 4, 263
- SEIGLER, D.S. (1976d). Biochem. Syst. Ecol. 4, 235
- SEIGLER, D.S. (1977a). Progress in Phytochem. 4, 83
- SEIGLER, D.S. (1977b). Econom. Bot. 30, 395
- SEIGLER, D.S. und D. KENNARD (1977c). Phytochem. 16, 1826
- SHIMIDA, M. und E.E. CONN (1977). Arch. Biochem. Biophys. 180, 199

- SOSA, A., F. WINTERITZ, R. WYLDE und A.A. PAVIA
(1977). *Phytochem.* 16, 707
- STAHL, E. (1967). *Dünnschichtchromatographie* p. 361,
Springer Verlag Berlin
- STENLID, G. (1963). *Physiol. Plant.* 16, 110
- STENLID, G. (1968). *Physiol. Plant.* 21, 882
- STENLID, G. (1970). *Phytochem.* 9, 2251
- STEYN, D.G. und C. RIMINGTON (1935). *Ond. J. Vet. Sci.*
Anim. Ind. 4, 51
- SWEELY, C.C., R. BENTLEY, M. MAKITA und W.W. WELLIS
(1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2497
- TANTISEWIE, B., H.W.L. RUIJGROK und R. HEGNAUER (1969).
Pharm. Weekblad 104, 1341
- TAPPER, B.A., M.A. MCDONALD (1974). *Canad. J. Microbiol.*
20, 563
- TSCHIERSCH, B. (1963). *Flora* 153, 115
- TSCHIERSCH, B. (1966). *Flora Abt. A* 157, 43
- TSCHIERSCH, B. (1967). *Die Pharmazie* 22, 67
- UNDERHILL, E.W. und L.R. WETTER (1969). *Plant Physiol.*
44, 584
- VAN ETEN, C.H. und M.E. DAXENBICHLER (1971). *J. Agr.*
Food Chem. 19, 195
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E. (1958). In: W. RUHLAND (Hrsg.),
Handbuch d. Pflanzenphysiologie p. 433, Springer
Verlag, Berlin
- WATT, J.M. und M.G. BREYER-BRANDWIJK (1962). *Medical*
and Poisonous Plants of Southern and Eastern
Africa, 2. Aufl., Edinburgh
- WEISS, M. (1960). *Flora* 149, 386
- WIEHLE, H. und E. HORAK (1972). *J. Chrom.* 47, 527
- WODINSKY, J. und J.K. SWINIARSKI (1975). *Canc. Chemo-*
ther. Rep. 59, 939
- ZILG, H., A. BRIAN, A. TAPPER und E.E.CONN (1972).
J. Biol. Chem. 247, 2348

DANKSAGUNGEN

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Pohl (†) für die Arbeitsmöglichkeit am Institut für Pharmazeutische Biologie und die Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Rimpler möchte ich für seine Unterstützung bei der Weiterführung der Arbeit danken.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Nahrstedt für die Auswahl des Themas, sein unermüdliches Interesse am Fortgang der Arbeit, die vielen klärenden Diskussionen sowie für seine zahlreichen Anregungen und seine stetige Förderung.

Herrn Privatdozent Dr. W. Hänsel vom Institut für Pharmazeutische Chemie und Herrn Dr. D. Hunkler vom Lehrstuhl für Organische Chemie danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren.

Dem Institut für Pharmazeutische Chemie danke ich apporative Hilfe.

Frau G. Siudzinski und Frau C. Forth danke ich für technische Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Bei allen Freunden und Kollegen, die mich durch Diskussionen und Ratschläge gefördert haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und meinen Schwiegereltern, ohne deren großzügige Unterstützung diese Arbeit nicht hätte angefertigt werden können.

LEBENS LAUF

3. 10. 1949 geboren in Bielefeld
Vater: Apotheker Herbert Hübel
Mutter: Apothekerassistentin
 Elisabeth Hübel, geb. Welzel

1956 - 1958 Volksschule in Neersen/Rhld.
1958 - 1960 Volksschule in Blankenstein/Ruhr
1960 - 1968 Staatliches Gymnasium Bochum
20. 5. 1968 Reifeprüfung
1968 - 1970 Praktikum in der Alten Apotheke
 zu Bochum

24. 6. 1970 Pharmazeutische Vorprüfung in
 Arnsberg

1970 - 1973 Studium der Pharmazie in Marburg/L.
5. 11. 1973 Pharmazeutisches Staatsexamen
8. 11. 1973 Approbation als Apotheker
Nov. 1973 Beginn der vorliegenden Arbeit
Tätigkeit als Wissenschaftliche
Hilfskraft vom 1. 11. 73 bis 30.9.74
und 1. 5. 77 bis 31. 7. 77
GFG-Förderung vom 1. 10. 74 bis 30.9.76

seit dem Tätigkeit als Wissenschaftlicher Assis-
1. 10. 1977 tent an der TU Braunschweig

